



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical



**APLICAÇÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES PARA O DIAGNÓSTICO DA
PNEUMOCISTOSE**

Marta Maria Ramos Soares Ribeiro

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Marta Ribeiro
2015

**APLICAÇÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES PARA O
DIAGNÓSTICO DA PNEUMOCISTOSE**





Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**APLICAÇÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES
PARA O DIAGNÓSTICO DA PNEUMOCISTOSE**

Marta Maria Ramos Soares Ribeiro

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS**

DEZEMBRO, 2015



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

APLICAÇÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES PARA O DIAGNÓSTICO DA PNEUMOCISTOSE

Marta Maria Ramos Soares Ribeiro

Orientador: Professora Doutora Olga Matos

Coorientador: Investigador Fernando Cardoso e Doutor Francisco Esteves

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre no ramo das Ciências Biomédicas, realizada sob a orientação científica da Doutora Olga Matos e coorientação científica do Investigador Fernando Cardoso e do Doutor Francisco Esteves.

Dezembro, 2015

Dedicatória

Dedico aos meus pais, irmã e avós...

Dissertação escrita de acordo com o novo acordo ortográfico

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais pelo apoio incondicional e por me deixarem lutar por aquilo em que acredito.

À minha irmã mais velha por me apoiar e defender ao longo desta etapa.

À minha orientadora Professora Dra. Olga Matos pelo apoio e disponibilidade no decorrer de todo o projeto.

Um especial agradecimento ao meu coorientador Investigador Fernando Cardoso pelo apoio incondicional, paciência, disponibilidade e amizade.

Ao meu coorientador Francisco Esteves pelo apoio e transmissão de conhecimentos no ano de voluntariado e no início deste projeto.

Às minhas melhores amigas Madalena Beça, Monica Bastos e Joana Reis por me apoiarem e nunca me deixarem desistir de aquilo em que acredito.

Aos meus colegas de mestrado Adriana Temporão, Bianca Parreira, Bruno Conchinha, Catarina Azevedo e Marta Palmeirim por fazerem parte de mais uma etapa da minha vida.

Ao meu colega de bancada Jorge Figueiredo pela ajuda, paciência, mas essencialmente pelos momentos de descontração.

Ao Artista Joaquim Lourenço pelas excelentes ilustrações.

Por último, mas não menos importante, ao meu namorado Miguel Simões pelo apoio, carinho, amor, encorajamento e essencialmente por acreditar em mim.

Resumo

A pneumonia causada por *Pneumocystis*, conhecida por pneumocistose, ou PPC, é uma doença de alto relevo e preocupação a nível de saúde pública. O seu rápido diagnóstico é de grande importância, visto ser uma doença fatal em indivíduos com imunossupressão. Como tal, é imprescindível a continuação da pesquisa de novas abordagens de diagnóstico rápido para esta doença. A aplicação de anticorpos recombinantes adquiridos pela técnica de *Phage display* pode ser uma grande mais valia, não só do ponto de vista de diagnóstico, não tendo de se recorrer a *kits* de diagnóstico, como também terapêutico.

Este estudo teve por objetivo a produção de fragmentos de anticorpos recombinantes com o auxílio da técnica de *Phage display*, para diagnóstico da pneumocistose.

A fim de se pesquisar os anticorpos recombinantes monoclonais específicos para *P. jirovecii* foram realizados três estudos. No primeiro e segundo estudos, a pesquisa dos anticorpos recombinantes fez-se através de amostras biológicas aleatórias de lavados broncoalveolares (LBA) de doentes com presença de *P. jirovecii*. Para o terceiro estudo foi utilizada uma proteína recombinante purificada MsgC - glicoproteína *Major* de superfície (do inglês, *Major surface glycoprotein*) de *P. jirovecii*, a qual é composta por três fragmentos de péptidos imunogénicos. Na captura de fragmentos recombinantes anti-*P. jirovecii*, utilizaram-se no primeiro estudo três bibliotecas combinatórias de fragmentos de anticorpos recombinantes (*scFv* – *Griffin I.*, *Tomlinson J e I*) e apenas uma biblioteca (*Griffin I.*) para o segundo e terceiro estudos.

No primeiro estudo obtiveram-se partículas fágicas monoclonais cuja presença foi validada com o antígeno MsgC, apresentando sequências com 550 a 750 pb, tamanho expectável para *scFv*. Na fase de produção de *scFv* em *E. coli HB2151*, não houve expressão de *scFv*, possivelmente, devido à sequência recombinante obtida possuir um codão terminal amber TGA em excesso, o que impossibilita a sua expressão.

Para o segundo e terceiro estudos os resultados foram inconclusivos.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se assumir que apenas com a utilização de antígeno puro (MsgC recombinante) haverá maior hipótese de se obter *scFv* para poder utilizar no diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis*.

Abstract

Pneumocystis pneumonia, also known as pneumocistosis or PcP, is a big concern in terms of public health. Naturally, a rapid diagnosis of this disease is of great importance, since it is fatal in individuals with immunosuppression. Due to this, it is essential to discover new methods to rapidly diagnose this disease. The application of recombinant antibodies obtained by phage display technique can be a great asset in this endeavour, not only for diagnosis but also as a therapeutic method.

This study main aim was the production of recombinant antibody fragments using the phage display technique to diagnose PcP.

In order to search for specific recombinant monoclonal antibodies for *P. jirovecii*, three studies were performed. In the first and second studies, recombinant antibodies were produced using random biological samples of bronchoalveolar lavage of patients infected with *P. jirovecii*. In the last study was used as a sample a purified recombinant protein MsgC - major surface glycoprotein of *P. jirovecii*, which is made of three fragments of immunogenic peptides. To capture anti-*P. jirovecii* recombinant fragments in the first study were used three combinatorial libraries of recombinant antibody fragments (scFv - Griffin1., Tomlinson I and J) whereas only one library (Griffin 1.) was used in the remaining studies.

In the first study were obtained monoclonal phage particles, whose presence was validated with MsgC antigen, which presented between 550-750 bp, an expected size for scFv. ScFv production using *E. coli* HB2151 was unsuccessful since there was no expression of scFv. Potentially this was due to an amber termination codon TGA present in the recombinant sequence, which prevented its expression. The results for the second and third studies were inconclusive.

Based on these results, we can conclude that using a purified antigen (e.g. recombinant MsgC) increases the odds of obtaining scFv that can be used in the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia.

Índice

Dedicatória	iii
Agradecimentos.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
Índice de Figuras.....	xiv
Índice de Quadros	xvii
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xviii
1. Introdução	1
1.1 Caracterização de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	2
1.1.1 História.....	2
1.1.2 Taxonomia	3
1.1.3 Morfologia.....	4
1.1.4 Ciclo de Vida.....	5
1.2 Transmissão e clínica.....	7
1.3 Fisiopatologia	8
1.3.1 Resposta Imunológica adaptativa celular	8
1.3.2 Resposta imunológica adaptativa humoral.....	9
1.4 Epidemiologia.....	10
1.5 Profilaxia e tratamento.....	10
1.6 Diagnóstico laboratorial	11
1.6.1 Diagnóstico microscópico	12
1.6.1.1 Exame citoquímico	12
1.6.1.2 Imunofluorescência	13
1.6.2 Diagnóstico Molecular	13
1.6.2.1 PCR.....	14
1.7 Novas Abordagens de Diagnóstico Molecular.....	14
1.7.1 Anticorpos como ferramentas de diagnóstico molecular	14
1.7.1.1 Anticorpos monoclonais	15
1.7.1.2 Anticorpos recombinantes	16
1.7.2 Produção de anticorpos monoclonais recombinantes utilizando bacteriófagos.....	17

1.7.2.1 Técnica de exibição de fagos (<i>Phage display</i>)	17
2. Objetivo	21
2.1 Objetivo de estudo	22
3. Material e Métodos	22
3.1 Amostras biológicas	23
3.2 Metodologias	23
3.2.1 Bibliotecas de fragmentos de anticorpos	24
3.2.2 <i>Phage-display</i>	25
3.2.2.1 Fago auxiliar (<i>Helper Phage</i>)	25
3.2.2.2 Imobilização do antígeno em imunotubo	26
3.2.2.3 Eluição com bibliotecas de <i>scFv</i>	27
3.2.2.4 Amplificação dos fagos selecionados	27
3.2.2.5 Amplificação de partículas fágicas policlonais	27
3.2.2.6 Novas rondas de seleção	28
3.2.2.7 Bioseleção com anticorpo anti-quisto de <i>P. jirovecii</i>	28
3.2.2.8 Bioseleção com Glicoproteína Major de superfície de <i>P. jirovecii</i> – MsgC	28
3.2.3 ELISA indireta	29
3.2.4 Seleção e expressão de partículas fágicas monoclonais	30
3.2.4.1 ELISA indireta	31
3.2.5 Seleção e expressão de fragmentos de anticorpos solúveis	31
3.2.5.1 Extração do periplasma	32
3.2.5.2 ELISA indireta	33
3.2.6 Teste de Imunofluorescência	33
3.2.7 PCR	34
3.2.7.1 Gel de eletroforese	35
3.2.8 Pré-extração de ADN-plasmídico (Miniprep)	35
3.2.9 Sequenciação	36
3.2.9.1 Análise de sequências	36
4. Resultados	38
4.1 Seleção de partículas fágicas pela técnica de <i>Phage display</i>	39
4.1.1 Validação da presença de partículas fágicas em cada ronda de seleção efetuada	40
4.1.2 Seleção de partículas fágicas policlonais obtidas com <i>Phage display</i> na presença de um antígeno	41

4.1.3 Seleção de partículas fágicas policlonais obtidas em <i>Phage display</i> na presença de três antígenos	42
4.1.4 Expressão e seleção de partículas fágicas monoclonais	44
4.1.5 Seleção e expressão de fragmentos de anticorpos solúveis	46
4.2 Isolamento do ADN plasmídico dos clones selecionados	47
4.3 Seleção de partículas fágicas monoclonais por teste de Imunofluorescência	49
5. Discussão e conclusão	50
5.1 Seleção e expressão de regiões variáveis de fragmentos de anticorpos.....	51
5.1.1 Seleção e expressão de regiões variáveis de fragmentos de anticorpos utilizando como antígeno lavado broncoalveolar.....	51
5.1.2 Seleção e expressão de regiões variáveis de fragmentos de anticorpos utilizando como antígeno lavado broncoalveolar e anticorpo anti-quisto de <i>P. jirovecii</i> e MsgC	54
5.2 Conclusões	56
6. Referências bibliográficas.....	57
Anexos	66
Anexo 1.....	67
Anexo 2.....	69
Anexo 3.....	71

Índice de Figuras

Figura 1. (A) Imagem ilustrativa de uma forma trófica de <i>P. jirovecii</i> e respectivos organelos. (B) Imagem ilustrativa de uma forma quística de <i>P. jirovecii</i> e respectivos organelos, adaptado de (Souza and Benchimol 2005).....	4
Figura 2. Imagem ilustrativa de todos os estádios do Ciclo de Vida do <i>Pneumocystis jirovecii</i> , no exterior das células alveolares, Pneumócitos tipo I.....	5
Figura 3. Imagem ilustrativa do ciclo de vida do <i>Pneumocystis jirovecii</i> nos alvéolos pulmonares. Duas formas de reprodução do microrganismo. (A) Local da transmissão da infecção. (B) reprodução assexuada e (C) reprodução sexuada.	6
Figura 4. Amostras de <i>Pneumocystis jirovecii</i> em lavados broncoalveolares colorados. (A) Formas quísticas coradas com cristal violeta. (B) Vários estádios do ciclo de vida do <i>Pneumocystis jirovecii</i> corados com Giemsa, quisto maduro com oito corpos intraquísticos (seta de cima) um esporócito mononuclear (seta do meio) e formas tróficas (seta de baixo). (C) Aglomerados de formas tróficas do <i>Pneumocystis jirovecii</i> entre outros estádios do ciclo de vida do mesmo, corados com Giemsa (adaptado de Calderón et al. 2010)	12
Figura 5. Ilustração esquemática da estrutura de um anticorpo IgG. L - cadeia leve, H – cadeia pesada, VL - região variável da cadeia leve, VH - região variável da cadeia pesada, CL – região constante da cadeia leve, CH1, CH2 e CH3 – regiões constantes da cadeia pesada. <i>Linker</i> – péptido de ligação entre as regiões variáveis de cadeia leve e pesada que formam as <i>scFv</i> (adaptado de (Fukuda 2012)).....	15
Figura 6. Desenho explicativo do fago filamentoso M13 com <i>scFv</i> na superfície, adaptado de(Ahmad, Yeap, Ali, Ho, Alitheen, et al. 2012).....	18
Figura 7. Desenho esquemático da replicação de fagos pela técnica de <i>Phage display</i>	19
Figura 8. Desenho esquemático das quatro fases do método de <i>biopanning</i> . A) imobilização do antígeno-alvo a uma superfície sólida de plástico juntamente com as bibliotecas <i>scFv</i> ; B) sucessivas lavagens para eliminação de ligações não específicas; C) amplificação de ligações específicas através de um vetor bacteriano; D) amplificação das partículas fágicas, adaptado de (Tonelli et al. 2013).	20
Figura 9. Fluxograma de toda a metodologia utilizada neste estudo.....	24
Figura 10. Imagem ilustrativa do método de ELISA indireta para seleção dos <i>biopannings</i> na presença de antígeno MsgC.	30
Figura 11. Médias das absorvâncias, e respetivo desvio padrão, medidas por espectrofotometria (405nm) de todas as rondas de seleção com partículas fágicas, dos três estudos, testadas na presença e ausência de antígeno - MsgC.....	42
Figura 12. Médias das absorvâncias, e respetivo desvio padrão, medidas em espectrofotometria no comprimento de onda de 405nm de todas as rondas de seleção com partículas fágicas, dos três estudos, testadas na presença de dois antígenos de <i>P. jirovecii</i> (MsgC e <i>pool</i> de amostras de LBA positivas para PPc) e uma <i>pool</i> de amostras negativas para PPc.	43

Figura 13. Médias das absorvâncias medidas em espectrofotometria no comprimento de onda de 405nm dos clones isolados selecionados com partículas fágicas monoclonais, testadas na presença de antígeno - MsgC.	44
Figura 14. Médias das absorvâncias, e respetivo desvio padrão, medidas em espectrofotometria no comprimento de onda de 405nm dos clones isolados selecionados com partículas fágicas monoclonais, testadas na presença de dois antígenos de <i>P. jirovecii</i> (MsgC e <i>pool</i> de amostras de LBA positivas para PPc) e uma <i>pool</i> de amostras negativas para PPc.	45
Figura 15. Fotografia dos resultados da reação da purificação do ADN plasmídico de três colónias de <i>E.coli TO10F</i> transformadas com o vetor <i>pHEN2</i> para a produção dos três clones selecionados anteriormente em gel de eletroforese. Na fotografia encontra-se representado o marcador de peso molecular 1k pb (M), Clone 3, Clone 4 e o Clone 5. As bandas representadas atingem os valores da presença de mais de 1000 pb por ADN plasmídico.	47
Figura 16. Fotografia dos resultados do ensaio de PCR para validação da presença de anticorpos recombinantes em três dos clones selecionados anteriormente e do controlo em gel de eletroforese. Na fotografia encontra-se representado o marcador de peso molecular 1k pb (M), Clone 3, Clone 4 e o Clone 5. As bandas representadas atingem os valores entre 550 a 750 pb em cada um dos resultados.	48
Figura 17. Sequência de aminoácidos deduzida das sequências nucleotídicas do site EMBOSS. As CDR1-3 representam as regiões determinantes complementares dos domínios das cadeias leves e pesadas. <i>Linker</i> e histidina (H) representam características da presença do vetor plasmídico.	49
Figura 18. Ensaio de imunofluorescência: Partícula fágica monoclonal (clone 5) utilizado como primeiro anticorpo neste ensaio, seguido da adição do Anti-FD e de TRITC anti-coelho, para deteção do antígeno <i>P. jirovecii</i> . Ampliação= x400; Escala= 100µm.	49
Figura A19. Vector pHEN2. Representação esquemática do vector pHEN2 fagomídeo (biblioteca Griffin 1.). Líder pelB: sinal de sequência peptídica de pectato-liase bacteriana que medeia a secreção para o espaço periplásmico; VH: fragmento variável de cadeia pesada; VL: cadeia leve; 6xHis: 6 histidina-tag; myc: myc-tag; âmbar: âmbar códon de parada; N1, N2, C-term: porções do N- e C-terminal da proteína pIII do fago capsídeo; LMB3 e pHENSeq: iniciadores utilizados para a sequenciação do domínio VH e VL, CAG GAA ACA GCT ATG AC e CTA TGC GGC CCC ATT CA, respetivamente(McCafferty et al. 1990).	67
Figura A20. Vector pIT2. Representação esquemática do vector pIT2 fagomídeo (biblioteca Tomlinson). Líder pelB: sinal de sequência peptídica de pectato-liase bacteriana que medeia a secreção para o espaço periplásmico; VH: fragmento variável de cadeia pesada; VL: cadeia leve; 6xHis: 6 histidina-tag; myc: myc-tag; âmbar: âmbar códon de parada; N1, N2, C-term: porções do N- e C-terminal da proteína pIII do fago capsídeo; LMB3 e pHENSeq: iniciadores utilizados para a sequenciação do domínio VH e VL, CAG GAA ACA GCT ATG AC e CTA TGC GGC CCC ATT CA, respetivamente.	68
Figura A21. Gráfico representativo da presença de partículas fágicas em cada uma das rondas referente a todas as bibliotecas nos três estudos.	71

Índice de Quadros

Quadro 1. Composição dos <i>primers</i> utilizados para validação da presença da sequência nucleotídica das amostras de partículas fágicas monoclonais utilizadas.....	34
Quadro 2. Composição da mistura utilizada na amplificação por PCR	34
Quadro 3. Condições térmicas aplicadas na reação de PCR LongRange para amplificação específica da fração pretendida	35
Quadro 4. Resumo do processo de seleção de fagos.	39
Quadro 5. Quadro representativo da presença de partículas fágicas em cada uma das rondas de seleção efetuadas	40
Quadro A6. Absorvâncias medidas em equipamento nanodrop de todas as rondas de seleção realizadas no presente projeto.	69
Quadro A7. Absorvâncias medidas em equipamento de nanodrop dos três fagos <i>helper</i> utilizados no presente projeto	70

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

% – Percentagem

°C – Graus Celsius

μL – Microlitro

μM – Micromolar

Abs – Absorvância

ABTS – Ácido 2'-azino-bis, 6-3-etilbenzotiazolina-sulfônico (do inglês, 2,2'-azino-bis, 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

AcM – Anticorpos monoclonais

Anti-FD – Anticorpo anti-Bacteriofago

BSA – Albumina do soro bovino (do inglês, Bovine Serum Albumin)

BTB – Biópsia transbrônquica

CDR's – Regiões complementárias determinantes (do inglês, complementary determining regions)

CH1, CH2, CH3- Domínios carboxi-terminais constantes da cadeia pesada (do inglês: constant heavy)

CL- Domínio constante da cadeia leve (do inglês: constant light)

dATP – Desoxirribonucleótido de adenosina trifosfato (do inglês, deoxyadenosine triphosphate)

dCTP – Desoxirribonucleótido de citosina trifosfato (do inglês, deoxycytidine triphosphate)

ddH₂O – água destilada (do inglês, double-distilled water)

dGTP – Desoxirribonucleótido de guanina trifosfato (do inglês, deoxyguanosine triphosphate)

D.O. – Densidade ótica

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês, Deoxyribonucleic acid)

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos fosfatados (do inglês, Deoxyribonucleotide triphosphate)

E. coli – *Escherichia coli*

E.U.A – Estado Unidos da América

EDTA ácido etilenodiaminotetracético (do inglês, Ethylenediamine Tetraacetic Acid)

EI – Expetoração induzida

ELISA – do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Fw – Forward

g – Força gravítica

gpIII – Glicoproteína de superfície III

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

H₂O – Água

HAT – Hipoxantina, Aminopeterina e Timidina

HCl – Ácido clorídrico

IFI – Imunofluorescência indireta

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

IL – Interleucina

INF- γ – Interferão gama

IPTG – do inglês Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

Kb – Quilobases

KCl – Cloreto de potássio

KH₂PO₄ – Dihidrogenofosfato monopotássico

lacZ – Operação lac

LB – Meio de cultura Luria-Bertani

LBA – Lavado broncoalveolar

LHD – Desidrogenase láctica

LO – Lavado oral

M – Molar (mole/L)

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

MsgC – Glicoproteína major de superfície - C (do inglês, Major surface glycoprotein)

mtLSUrRNA – Subunidade grande do RNA ribossômico mitocondrial (do inglês, Mitochondrial Large Subunit ribossomal RNA)

Na₂HPO₄ – Hidrogenofosfato dissódico

NaCl – Cloreto de Sódio

pb – Pares de bases

PBS – Tampão fosfato salino (do inglês, Phosphate Buffered Saline)

PBS-T – Tampão fosfato salino suplementado com detergente Tween

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês, Polymerase Chain Reaction) pH – Potencial de hidrogénio pI – Ponto isoelétrico pmol – Picomole

PEG – Polietileno de glicol 8000

PEG/NaCl – Polietileno de glicol 8000 em Cloreto de Sódio

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (do inglês, Phenylmethylsulfonyl fluoride)

PaO₂ – Pressão alveolar de oxigénio

PPc – Pneumonia por Pneumocystis

PVA – Álcool polivinílico (do inglês, Polyvinyl Alcohol)

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês, ribonucleic acid)

rpm – Rotações por minuto

RT-qPCR – PCR quantitativo em tempo real (do inglês, Real-time quantitative PCR)

Rv – Reverse

scFv – Fragmentos de regiões variáveis de anticorpos (do inglês, Single chain fragment variable)

T CD4⁺ – Linfócitos T com recetores do agrupamento de diferenciação 4 (do inglês, cluster of differentiation)

T CD8⁺ – Linfócitos T com recetores do agrupamento de diferenciação 8 (do inglês, cluster of differentiation 8).

TAE - TrisAcetato e EDTA

TARV – Terapia anti retrovírica

TES – Tris-HCl, EDTA e Sacarose

TMP – Trimetoprim

TMP-SMZ -Trimetoprim-Sulfametoxazol

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, tumor necrosis factor alfa)

Tris-HCl – cloridrato de tris

TRITC – Tetrametilrodamina (do inglês, Tetramethylrhodamine)

TU – Unidade de transdução (do inglês, transducing-units)

UA – Unidade de absorvância

UFC - Unidade formadora de colónia

UNL – Universidade Nova de Lisboa

VH- Domínio variável de cadeia pesada (do inglês: variable domain of immunogloblin heavy chain)

VL - Domínio variável de cadeia leve (do inglês: variable light)

1. Introdução

Pneumocystis jirovecii, anteriormente designado como *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* (Stringer et al. 2002; Redhead et al. 2006) é atualmente descrito como um fungo atípico extracelular que se aloja nas vias respiratórias do homem; e provoca alterações patológicas respiratórias, mais severas em indivíduos imunocomprometidos, preferencialmente em infetados pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) (Wakefield 2002); a estas alterações patológicas se dá a designação de pneumocistose ou pneumonia por *P. jirovecii* (PPc) (Medrano et al. 2005; Redhead et al. 2006).

1.1 Caracterização de *Pneumocystis jirovecii*

1.1.1 História

A primeira descrição de *Pneumocystis* foi feita no Brasil pelo prestigiado médico Carlos Chagas, em 1909, enquanto prosseguia nas suas investigações sobre a tripanossomose humana americana. Ao inocular amostras de sangue de duas crianças com Tripanossomose em Porquinhos-da-índia, verificou a existência de formas quísticas de *Pneumocystis* nos pulmões, pensando ser uma nova forma de desenvolvimento de *Tripanosoma*, que denominando de: *Schizotrypanum* (Redhead et al. 2006; Aliouat-Denis et al. 2009).

Um ano após a descoberta de Chagas, o Dr António Carini (de origem taliana, trabalhando em São Paulo, Brasil) descobriu quistos semelhantes em pulmões de ratos (*Rattus norvegicus*) infetados por *Trypanosoma lewisi* e enviou essas amostras para o Instituto Pasteur em Paris. Os Drs. Pierre e Marie Delanoë, visualizaram os quistos enviados pelo Dr. Carini e identificaram-nos, também, nos pulmões de ratos não infetados por *Tripanosoma*. Esta constatação permitiu concluir que aquelas formas quísticas provinham de uma nova espécie de organismos que denominaram *Pneumocystis carinii*. A designação “*Pneumo*” é devido ao tropismo para o pulmão, “*cystis*” devido à sua forma quística e “*carinii*” em homenagem ao Doutor António Carini (Stringer 1996; Aliouat-Denis et al. 2009).

Até pouco antes da Segunda Guerra Mundial, as únicas formas de *Pneumocystis* detetadas eram as quísticas; em 1942 foram conhecidas as primeiras formas tróficas de *Pneumocystis* em humanos através de fotografias microscópicas tiradas por Van der Meer e Brug (Stringer 1996; Aliouat-Denis et al. 2009); ainda durante a Segunda Guerra Mundial, *Pneumocystis* foi finalmente identificado como um agente patogénico humano,

mas apenas em bebés prematuros e em crianças subnutridas (Wakefield 2002; Cushion 2004); de seguida começaram a ser reportados casos de pneumocistose em indivíduos outrora transplantados e com malformações físicas. A partir da década de 80 do século passado, a epidemia do VIH tornou a PPc um grave problema de saúde pública em todo o mundo (Calderón-Sandubete et al. 2002).

1.1.2 Taxonomia

A indefinição sobre a classificação taxonómica de *Pneumocystis jirovecii* arrastou-se durante décadas devido à dificuldade de propagação deste espécime *in vitro*.

Nos últimos anos, através das novas técnicas de Biologia Molecular nos foi possível o isolamento de *Pneumocystis* em várias espécies de mamíferos (como macaco, rato, homem, entre outros). Todavia, verificou-se que apenas no homem se conseguiu isolar o *P. jirovecii* (Souza & Benchimol 2005).

Hoje em dia através de análises de histoquímica e de ultraestruturas de *P. jirovecii* em tecido de pulmão de doentes com PPc, foi possível verificar a semelhança genética entre o RNA (ácido ribonucleico) ribossomal respetivo e dos fungos (Edman et al. 1988). Assim, pese embora, o facto de também ter sido notada falta de ergosterol na membrana celular tornando-o resistente aos inibidores biossintéticos de ergosterol – o que não é habitual em fungos – a comunidade científica aceitou classificá-lo como fungo (Morris & Norris 2012).

O primeiro parasitologista a verificar que há *Pneumocystis* específicos da lesão humana foi o Dr. Otto Jirovec (Checo); por isso e em sua homenagem esta espécie ficou designada por *P. jirovecii* (Stringer et al. 2002; Gigliotti 2005). Assim, atualmente a sua classificação taxonómica é a seguinte (Hibbett et al. 2007):

Super Reino Eukaryota
Reino Fungi
Sub-reino Dikarya
Filo Ascomycota
Sub-Filo Taphrinomycotina sensu
Classe Pneumocystidomycetes
Ordem Pneumocystidales
Família Pneumocystidaceae
Género *Pneumocystis*
Espécie *P. jirovecii*

1.1.3 Morfologia

O avanço da Microscopia Eletrônica permitiu a observação de pelo menos três formas do ciclo de vida de *P. jirovecii*, a saber, trófica, esporocística e quística. A forma trófica (trofozoito) é a forma mais desenvolvida do ciclo de vida de *P. jirovecii* e a mais representativa, encontrando-se cerca de 95% da população de *P. jirovecii* nesta fase no interior do alvéolo pulmonar do hospedeiro. Apresenta dimensões pequenas atingindo um diâmetro entre 1 a 4µm e uma morfologia esférica com camada fina, sendo predominantemente haploide mas apresentando por vezes configuração diploide (Wyder et al. 1998; Cornillot et al. 2002; Aliouat-Denis et al. 2009).

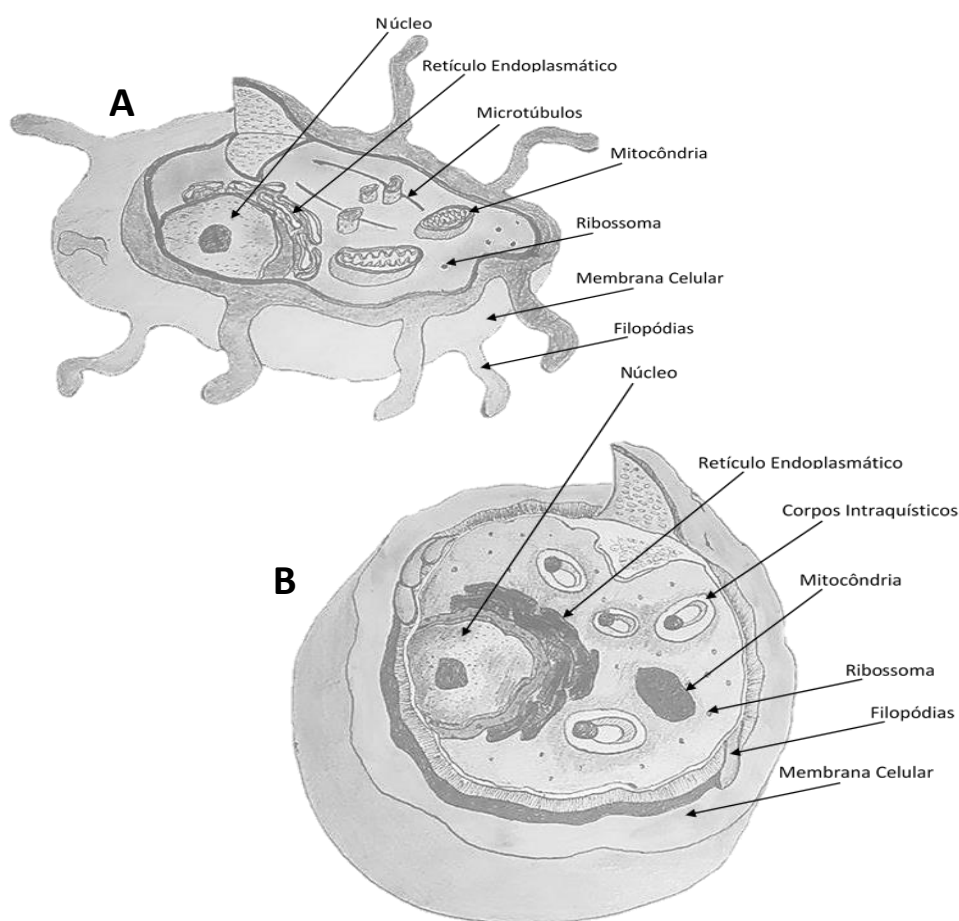


Figura 1. (A) Imagem ilustrativa de uma forma trófica de *P. jirovecii* e respectivos organelos. (B) Imagem ilustrativa de uma forma quística de *P. jirovecii* e respectivos organelos, adaptado de (Souza & Benchimol 2005)

Por vezes o trofozoito apresenta morfologia helicoidal e nesses casos alguns estudos relatam prolongamentos citoplasmáticos conhecidos como filopódias, que permitem ao organismo agarrar-se às células epiteliais hospedeiras, nos alvéolos pulmonares (Aliouat-Denis et al. 2008)

A forma esporocística é caracterizada em alguns trabalhos que referem uma forma mononuclear de parede fina em que o núcleo rapidamente entra em divisão meiótica evoluindo para o estágio de esporócisto, seguindo-se uma divisão mitótica e verificando-se no final oito esporocistos no seu interior, o que é característico da fase quística (Matsumoto & Yoshida 1984).

O quisto é ovoide composto por uma parede espessa, com diâmetro entre 5 a 7µm, com oito esporócistos. Estes apresentam formas irregulares desde redondos a ovóides com diâmetros entre 1 a 2µm, com apenas um núcleo e organelos bem desenvolvidos (mitocôndria, retículo endoplasmático rugoso e respetivos ribossomas) (Helweg-Larsen 2004)

1.1.4 Ciclo de Vida

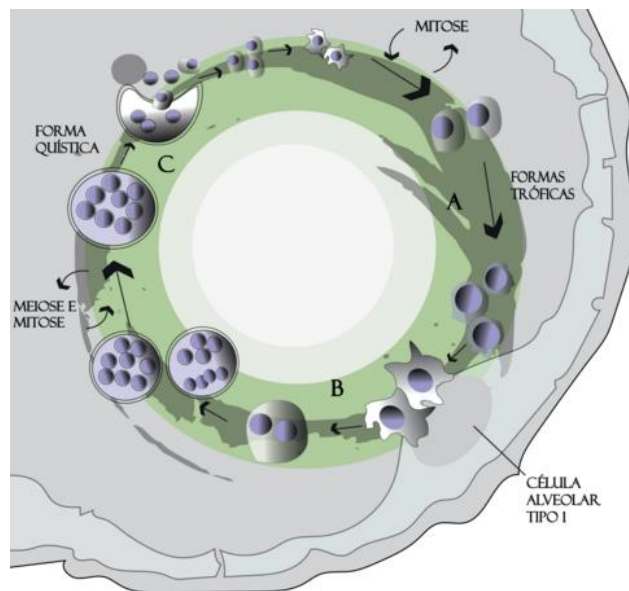


ILUSTRAÇÃO DE JOAQUIM ALVES LOURENÇO

Figura 2. Imagem ilustrativa de todos os estádios do Ciclo de Vida do *Pneumocystis jirovecii*, no exterior das células alveolares, Pneumócitos tipo I.

As espécies de *Pneumocystis* bem como as de outros fungos, usualmente apresentam uma reprodução sexuada completa dentro do seu hospedeiro (Beck & Cushion 2009). Embora, a maioria dos fungos a não complete.

Com o auxílio da microscopia eletrônica conseguiu-se identificar o gene recetor de feromonas - *Ste3*, no genoma de *Pneumocystis* que faz crer na possível existência de uma combinação entre formas tróficas (Smulian et al. 2001; Aliouat-Denis et al. 2009).

No ciclo de vida de *P. jirovecii*, o processo de divisão meiótica do produto da união de duas formas tróficas haploides, resulta na formação de uma célula diploide. De seguida, dá-se uma divisão mitótica formando um quisto imaturo que posteriormente irá evoluir para quisto maduro, preenchido por oito esporocistos haplóides. Finalmente, o quisto lisa e são libertados os oito esporócistos, transformando-se mais tarde em formas tróficas.

A presença em grande quantidade da forma trófica no hospedeiro (90-95%), poderá dever-se ao facto da proliferação de *Pneumocystis* ser realizada por fissão binária durante a fase da forma trófica (Cushion 2004; Helweg-Larsen 2004; Souza & Benchimol 2005).

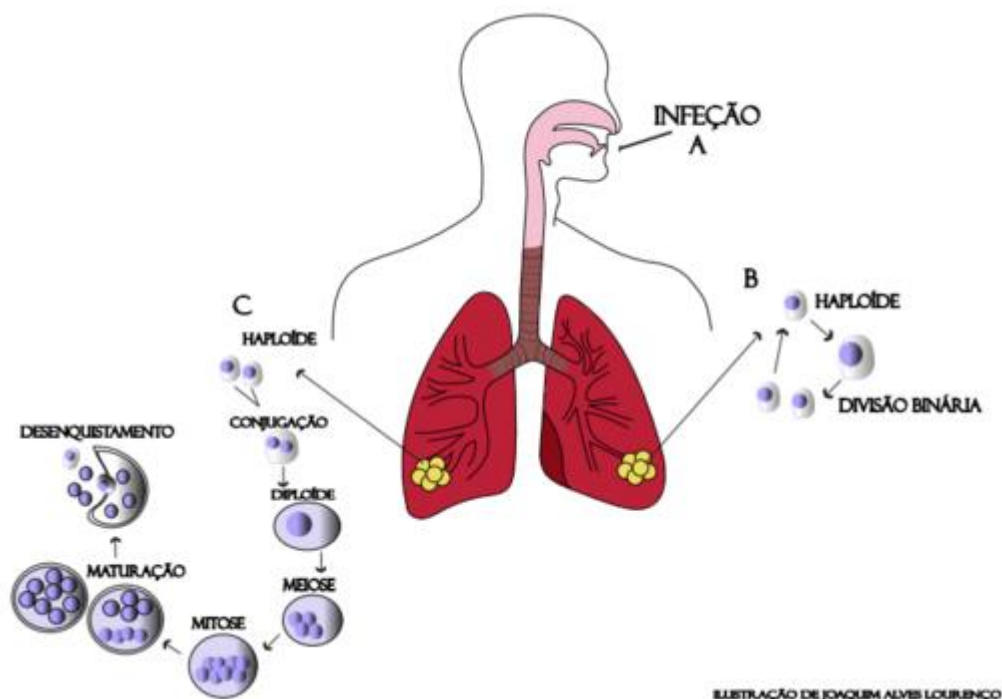


Figura 3. Imagem ilustrativa do ciclo de vida do *Pneumocystis jirovecii* nos alvéolos pulmonares. Duas formas de reprodução do microrganismo. (A) Local da transmissão da infecção. (B) reprodução assexuada e (C) reprodução sexuada.

1.2 Transmissão e clínica

A maioria dos aspetos ligados à transmissão da infeção por *P. jirovecii* ainda continua desconhecida. Porém, existem relatos de uma grande amostragem de crianças entre os 5 e 7 anos onde fora detetado *P. jirovecii*, mas que ficaram assintomáticas não vindo mesmo a desenvolver a doença no futuro.

Perante os casos de PPc em indivíduos seropositivos para VIH, sugere-se que o parasita tenha permanecido em estado latente nos pulmões desde a infância, desenvolvendo-se a PPc quando o hospedeiro sofre imunossupressão; contudo, outros estudos relatam a ocorrência de uma total eliminação do parasita após infeção, indicando um estado de latência limitado (Medrano et al. 2005).

Após uma análise de estudos efetuados em doentes transplantados e oncológicos, pôde-se observar a transmissão de diferentes genótipos de *Pneumocystis* de pessoa para pessoa.

Por outro lado, também foram reportados casos de técnicos de saúde, saudáveis, com presença de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) de *Pneumocystis* no trato respiratório superior, após terem tido contacto com doentes com PPc, indicando uma possível transmissão deste patógeno por via aérea (Calderón et al. 2010).

Pneumocystis é adquirido através do trato respiratório superior e começa por infetar os alvéolos pulmonares, liga-se às células epiteliais tipo I (pneumócitos tipo I) (Dei-Cas 2000) prejudicando as trocas de oxigénio entre o sangue e as células pulmonares e levando às alterações anteriormente descritas. O seu tempo de incubação no hospedeiro humano varia entre 3 a 12 semanas (Chinnappan & Lakshmi 2011).

A eclosão e a evolução da PPc podem variar com a condição de imunossupressão do doente. Dos grupos mais suscetíveis destacam-se os seropositivos para VIH que, normalmente têm sintomatologia quando a contagem de células linfócitos T auxiliares, TCD4+, é inferior a 200 células/mililitro. Nestes doentes a apresentação é subaguda e tardia (25-28 dias após a infeção) (Calderón et al. 2010).

Nos doentes seronegativos para VIH com outras imunodeficiências a sintomatologia aparece de forma súbita (Calderón et al. 2010). A pneumocistose apresenta sintomas que podem surgir em qualquer doença pulmonar: dores no peito, tosse com expectoração, dispneia e febre.

Em indivíduos com PPc é frequente encontrar-se marcadores laboratoriais não específicos, como o aumento dos níveis de desidrogenase (LHD) e baixa pressão alveolar de oxigênio (PaO₂), que conduz a hipoxia.

1.3 Fisiopatologia

1.3.1 Resposta Imunológica adaptativa celular

As formas tróficas de *Pneumocystis* são extremamente aderentes às células epiteliais de tipo I dos alvéolos pulmonares.

Em resposta à proliferação de *Pneumocystis*, os macrófagos vão ser recrutados por múltiplos sistemas de recetores, incluindo os recetores de manose, que irão interagir com a Glicoproteína Major de Superfície (MSG) de *Pneumocystis*.

Simultaneamente, os macrófagos também interagem com o β -D-glucano, que se encontram na parede quística do *Pneumocystis*, e com os recetores dos macrófagos, dectina-1 e *tool-like*. Nesta interação também se encontram presentes proteínas opsónicas como as IgG (Tasaka & Tokuda 2012).

Os macrófagos alveolares iniciam o reconhecimento, exercendo fagocitose e degradação de *Pneumocystis*.

Para uma maior eficácia na eliminação do fungo variadas citoquinas pró-inflamatórias são libertadas na sequência da ativação dos macrófagos e das células epiteliais pulmonares (Tasaka & Tokuda 2012).

Os linfócitos T auxiliares, TCD4+, possuem uma função essencial na defesa do hospedeiro. Estas células proliferam em resposta ao antígeno e geram o interferão (IFN) – γ que irá recrutar mais macrófagos ao local.

Por último, os macrófagos e células epiteliais libertarão interleucinas (IL) – 8 que irão recrutar neutrófilos, os quais têm como principal função remediar o dano causado no pulmão por parte do antígeno, libertando proteases e radicais de oxigénio (Tasaka & Tokuda 2012).

Normalmente a severidade da PPc é associada a uma inflamação por neutrófilos que irá resultar em dano dos alvéolos pulmonares, levando ao condicionamento de trocas gasosas e de dificuldades respiratórias.

Em doentes imunocomprometidos, mais especificamente em doentes seropositivos para VIH, os níveis insuficientes de IL-8 e de neutrófilos nos lavados broncoalveolares (LBA) indicam oxigenação deficitária.

Em doentes seronegativos para VIH sucede-se o contrário para os níveis de IL-8 em LBA. Estes factos indicam uma correlação com a oxigenação sanguínea. Sendo assim pode-se concluir que perante uma resposta imunitária mais eficaz há resultado de maior dano no pulmão (Tasaka & Tokuda 2012).

1.3.2 Resposta imunológica adaptativa humoral

Um dos maiores problemas no combate à PPc é a falta de produção de células T, embora alguns estudos indiquem que as células B também possuem de um papel significativo na eliminação deste fungo (S T et al. 1995).

Alguns estudos em soros de crianças e jovens (Vargas et al. 2001) detetaram anticorpos anti-*Pneumocystis*. Outros estudos, agora em adultos saudáveis também detetaram percentagens elevadas desses mesmos anticorpos, em vários locais do mundo (Smulian et al. 1993).

Durante muitos anos a deteção da PPc não era realizada com amostras serológicas, devido à informação de que o organismo infetado por *P. jirovecii* seria incapaz de produzir uma resposta humoral capaz (Walzer 1999). Contudo, estudos recentes em doentes seropositivos para VIH e com PPc utilizando o teste de ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), encontraram uma prevalência de IgG anti-*Pneumocystis* superior à encontrada em indivíduos seronegativos para VIH com PPc (Daly et al. 2004; Daly et al. 2006; Djawe et al. 2010; Palella et al. 2012). Assim, demonstra-se que os doentes seropositivos para VIH são capazes de desenvolver uma resposta humoral contra *Pneumocystis*. Recentemente, estudos demonstraram que fatores como a localização geográfica, episódios anteriores de PPc e a idade (Walzer et al. 2009) são parâmetros com influência na resposta humoral destes doentes.

1.4 Epidemiologia

Durante vários anos a PPc era associada apenas a indivíduos que fossem seropositivos para VIH, no entanto, atualmente já foram reportados casos de PPc em doentes imunocomprometidos seronegativos para VIH (Martinez et al. 2011).

Na década de 80 do século passado, a comunidade homossexual presenciou uma grande epidemia de VIH. Os toxicodependentes que partilhassem a mesma seringa eram outro grupo de risco importante (Miller et al. 2013). A epidemia progrediu de uma forma exponencial que se acredita ter afetado mais de 33.4 milhões de pessoas por todo o mundo, causando a morte de cerca de 25 milhões das mesmas. Normalmente, a PPc tem sido associada ao VIH/SIDA, devido não só a ser uma doença oportunista, como também devido ao aparecimento de novos casos de seropositivos para VIH com PPc na Europa como também nos Estados Unidos da América. (Huang et al. 2011) .

1.5 Profilaxia e tratamento

Aceita-se que deve fazer-se sempre a profilaxia da PPc nos doentes seropositivos para VIH, mulheres grávidas e doentes que estejam a fazer terapêutica antirretrovírica (TARV), com células TCD4+ inferiores a 200 células/mm³, ou se apresentarem um quadro clínico com outro tipo de doença oportunista (Calderón et al. 2010).

Os fármacos mais utilizados em profilaxia anti-PPc são o Trimetoprim-Sulfametoxazol (TMP-SMZ), devido ao seu baixo custo e alta eficácia, mas a Pentamidina, a Dapsona e a Atovaquona também podem ser aconselhadas (Anevla et al. 2012).

Como primeira linha de tratamento, dependendo da severidade da doença, normalmente é utilizada a combinação de fármacos TMP-SMZ que inibe a via metabólica dos folatos. Como segunda linha, e também em casos de PPc severa, é utilizado a Pentamidina em aerossol, que inibe a via metabólica do ácido para-aminobenzóico, a glicólise anaeróbia, fosforilação oxidativa e a síntese proteica. Como tratamento de segunda linha, mas em casos em que a PPc é ligeira ou moderada, é utilizada a combinação de fármacos Primaquina-clindamicina que inibe a síntese proteica e a cadeia respiratória. Em alternativas àqueles fármacos de segunda linha, e para casos em que a PPc se encontra controlada, são utilizados os fármacos Dapsona (TMP) e Trimetrexato

que inibem também a síntese da via metabólica dos folatos, ou também o fármaco Atovaquona que inibe o citocromo b (Anevlavis et al. 2012).

1.6 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da pneumocistose nem sempre é de fácil concretização, devido não só a evolução silenciosos no doente seropositivo para VIH levando a um diagnóstico tardio, como também por os sintomas poderem ser camuflados por outras doenças já presentes no organismo do doente (Cushion 2004; Thomas & Limper 2004; Cushion & Smulian 2006).

O diagnóstico é efetuado a partir de espécimes respiratórios obtidos por variados métodos de recolha: lavado oral (LO), expetoração induzida (EI), lavado broncoalveolar (LBA) ou por biópsia transbrônquica (BTB).

A indução de expetoração é um dos procedimentos mais utilizados para a recolha de amostras (expetoração induzida – EI), devido ao seu baixo teor invasivo e baixo custo. Esta técnica apresenta, contudo, uma sensibilidade de diagnóstico entre os 50 a 90%. A recolha de EI é realizada pela inalação de uma solução salina por parte do doente e posterior aspiração desta solução (Calderón et al. 2010)

O lavado broncoalveolar (LBA) é realizado por broncofibroscopia, mas é um método mais invasivo que o anterior e com risco de pneumotórax. Contudo, tem eficácia de 90%. Apenas é utilizado em alguns hospitais se os resultados das EI não forem verossímeis ou conclusivos (Calderón et al. 2010).

A biópsia transbrônquica (BTB) é um procedimento extremamente invasivo, principalmente para doentes em que o sistema imunológico se encontra muito debilitado. Esta técnica é utilizada apenas em casos em que testes anteriores apresentem resultados negativos para *P. jirovecii*, mas a suspeita da presença do mesmo se mantenha. Apresenta sensibilidade de diagnóstico de 100%, sendo consecutivamente o método mais fidedigno.

1.6.1 Diagnóstico microscópico

1.6.1.1 Exame citoquímico

Para realização de diagnóstico de PPC fidedigno é necessária uma análise detalhada dos espécimes pulmonares ao microscópio após coloração, para observação dos quistos ou formas tróficas de *Pneumocystis*.

Normalmente, as formas tróficas de *Pneumocystis* conseguem ser detetadas através de coloração de Giemsa, Gram, e Ziehl-Neelsen (Keynan et al. 2015) e observadas a microscópio eletrônico. As formas quísticas conseguem ser visualizadas também em microscópio ótico após coloração com cristal violeta. Alternativamente, ambas as formas de desenvolvimento podem ser detetadas em amostras de expetoração induzida ou LBA, através de anticorpos monoclonais, devido à sua alta especificidade e sensibilidade (Thomas & Limper 2004). Assim, a detecção de *Pneumocystis* pode ser realizada por métodos de ligação antigénio-anticorpo, como ELISA indireta (Daly et al. 2004) e Imunofluorescência direta e indireta. Neste último caso dá-se uma ligação de um anticorpo monoclonal específico marcado com fluoresceína (molécula emissora de fluorescência) ao antigénio, e quando a amostra é exposta num microscópio de fluorescência a um comprimento de onda de 475 nanómetros (nm) consegue-se observar os quistos e ou formas tróficas de *P. jirovecii* (Bava et al. 2002).

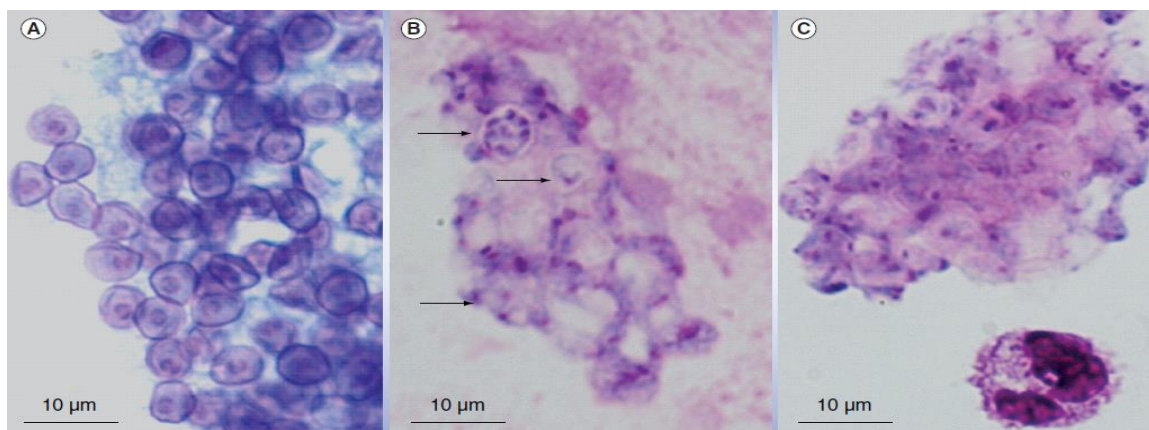


Figura 4. Amostras de *Pneumocystis jirovecii* em lavados broncoalveolares colorados. (A) Formas quísticas coradas com cristal violeta. (B) Vários estádios do ciclo de vida do *Pneumocystis jirovecii* corados com Giemsa, quisto maduro com oito corpos intraquísticos (seta de cima) um esporócito monomuclear (seta do meio) e formas tróficas (seta de baixo). (C) Aglomerados de formas tróficas do *Pneumocystis jirovecii* entre outros estádios do ciclo de vida do mesmo, corados com Giemsa (adaptado de Calderón et al. 2010)

Por sua vez, os testes serológicos para detecção de anticorpos anti-*Pneumocystis* nem sempre são eficazes devido ao facto de doentes imunocomprometidos não terem capacidade de produzir anticorpos em quantidades suficientes para poderem ser detetados pelos métodos de imunofluorescência e ELISA (Rath & Steinmann 2014). Porém, em indivíduos saudáveis com presença de anticorpos anti-*P. jirovecii*, estes testes têm valor, e são usados essencialmente para estudos epidemiológicos (Rath & Steinmann 2014).

1.6.1.2 Imunofluorescência

Por vezes, a detecção por exames citoquímicos pode ser pouco viável, uma vez que se torna difícil a discriminação entre esporos de leveduras e formas quísticas de *P. jirovecii*. A utilização de coloração por Imunofluorescência e posterior visualização em microscópio de fluorescência com anticorpos monoclonais anti-*P.jirovecii* resolve esse problema, corando não só formas tróficas como quísticas (Rath & Steinmann 2014).

1.6.2 Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular tem como principal objetivo a avaliação de estruturas de componentes de ADN. Através deste tipo de diagnóstico, não só é possível detetar o agente causador de doença como também as alterações genéticas do mesmo, auxiliando assim, no prognóstico da doença e na avaliação da sua suscetibilidade para posterior determinação da melhor terapêutica.

Como todo o procedimento experimental possui vantagens: identificação rápida e eficaz (contendo uma alta especificidade e sensibilidade de diagnóstico) do agente infeccioso causador de doença mesmo que este se encontre em baixas concentrações, assim como a versatilidade de amostras (não sendo necessária a viabilidade do agente infeccioso). Mas também possui desvantagens: fácil contaminação de amostras, presença de inibidores, altos custos e padronização.

O diagnóstico molecular apenas deve ser tido em conta quando o diagnóstico microscópico não consegue identificar *P. jirovecii*. Nos casos em que o teste citoquímico é negativo e o teste molecular dá positivo, podemos estar na presença de uma colonização pelo fungo, mas não da doença propriamente dita (Huggett et al. 2008), dada a grande sensibilidade e especificidade deste tipo de testes.

A elaboração de técnicas moleculares utilizando genes do agente infeccioso, não só são bastante relevantes para diagnosticar e quantificar o agente como também são utilizadas para estudos epidemiológicos de PPc por comparação de genótipos (Atzori et al. 2007; Monroy-Vaca et al. 2013).

1.6.2.1 PCR

Foram relatados vários estudos referentes à amplificação de ADN de *Pneumocystis*, a partir de amostras de espécimes respiratórios, por PCR (do inglês: *Polymerase chain reaction*) convencional, *Nested-PCR* (modificação do PCR que se destina a reduzir a ligações de produtos não específicas) e qPCR (do inglês: *real time quantitative PCR*) baseados na amplificação de um fragmento de ADN complementar de uma subunidade complexa do RNA ribossômico mitocondrial (mtLSUrRNA). Utilizando este procedimento conclui-se que é possível diagnosticar a PPc com uma grande eficácia, conseguindo-se identificar não só a espécie do organismo como também os seus genótipos. Desta forma, esta metodologia torna-se assim, um grande avanço para o diagnóstico clínico e para administração da terapêutica mais correta em caso de doença (Thomas & Limper 2004; Calderón et al. 2010). Atualmente, a técnica mais utilizada para quantificar e amplificar o ADN de *Pneumocystis*, em espécimes clínicos, é a de PCR quantitativa em tempo real (Huggett et al. 2008).

1.7 Novas Abordagens de Diagnóstico Molecular

1.7.1 Anticorpos como ferramentas de diagnóstico molecular

Os anticorpos também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), desempenham um papel fundamental no organismo dos mamíferos. As células conhecidas por produzirem os anticorpos são as células plasmáticas derivadas dos linfócitos B, conseguindo reconhecer com grande afinidade vários corpos estranhos ao nosso organismo.

As imunoglobulinas são constituídas por duas cadeias leves idênticas e, mais duas cadeias pesadas também idênticas, adotando uma conformação em forma de Y. As duas cadeias pesadas encontram-se ligadas por ligações não-covalentes e por duas ligações de dissulfato na parte terminal da conformação. A ligação entre as cadeias pesadas e leves também é feita por ligações não covalentes e uma de dissulfato. Cada uma das cadeias pesadas contém 3 regiões constantes dominantes (CH1, CH2 e CH3) e uma região variável dominante (VH), enquanto as cadeias leves apresentam apenas uma zona constante (CL) e outra variável (VL) como se pode observar na Figura 5. A região variável dominante contém regiões determinantes de complementaridade (do inglês; *complementarity determining regions* - *CDRs*) que irão formar o local de ligação do antígeno à molécula de anticorpo e assim determinar também o grau de especificidade entre as duas moléculas.

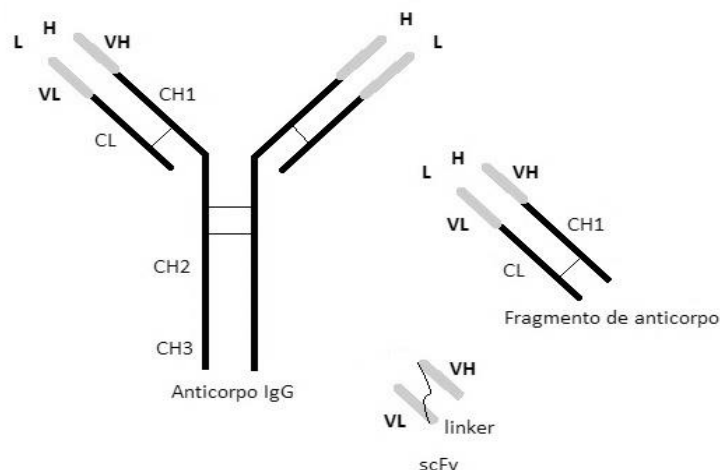


Figura 5. Ilustração esquemática da estrutura de um anticorpo IgG. L - cadeia leve, H – cadeia pesada, VL - região variável da cadeia leve, VH - região variável da cadeia pesada, CL – região constante da cadeia leve, CH1, CH2 e CH3 – regiões constantes da cadeia pesada. *Linker* – péptido de ligação entre as regiões variáveis de cadeia leve e pesada que formam as *scFv* (adaptado de (Fukuda 2012))

1.7.1.1 Anticorpos monoclonais

No final da década de 70 do século passado, Kohler e Milstein foram os pioneiros no desenvolvimento de anticorpos monoclonais ou AcM, colocando-os como uma nova ferramenta terapêutica e de apoio ao diagnóstico. A produção de AcM foi primeiramente descrita com base na injeção de um determinado antígeno num murgancho (modelo

animal), o qual, produz no seu baço um único clone de um único linfócito B. Após a imortalização do linfócito B específico é então produzido sempre o mesmo anticorpo em resposta ao antígeno-alvo. A imortalização é conseguida através da fusão entre células do baço (esplenócitos) com uma linha de células mielóide, por exemplo SP2/0 AG14, com capacidade de se reproduzirem indefinidamente. A fusão é realizada utilizando um agente fusogénico (PEG) dando origem a um hibridoma que depois é multiplicado em meio de cultura seletivo contendo HAT (Hipoxantina, Aminopeterina e Timidina); que irá eliminar assim linfócitos e células do mieloma não fundidas. O produto da fusão, é clonada e os anticorpos monoclonais são produzidos em meio de cultura (Ribatti 2014; Shukra et al. 2014).

Porém, estes métodos tradicionais de produção de anticorpos monoclonais têm desvantagens: são demorados, de custo elevado e a sua eficiência não depende só do técnico, mas também da capacidade do sistema imunitário do modelo animal utilizado de obter uma resposta humoral específica (produção de anticorpos para o antígeno-alvo). Com o avanço da Biologia Molecular têm surgido novas técnicas de construção e seleção de bibliotecas combinatórias, como a exibição de fagos, permitindo o isolamento de fragmentos de anticorpos humanos (do inglês, *single chain variable fragment - scFv*), *in vitro*, deixando assim de se recorrer, também, à manipulação de animais em laboratório (Liu 2014).

1.7.1.2 Anticorpos recombinantes

A primeira vez que foram clonados genes de anticorpos diretamente de linfócitos B de animais anteriormente imunizados, foi no final da década de 1980. Sequências peptídicas combinatórias desses genes foram reconstruídas através da clonagem de regiões variáveis das cadeias leves (VL) e pesadas (VH) de fragmentos de anticorpos humanos com afinidade para um determinado antígeno-alvo (Ahmad et al. 2012). Após o reconhecimento científico e tecnológico deste método, uma nova técnica de expressão de fragmentos funcionais de anticorpos foi descrita: seleção através de uma biblioteca de *scFv* aquando se ligam ao antígeno de interesse, dando-se o nome de seleção de anticorpos por afinidade (Bazan et al. 2012; Schirrmann et al. 2011).

1.7.2 Produção de anticorpos monoclonais recombinantes utilizando bacteriófagos

Os anticorpos recombinantes oferecem várias vantagens como ferramenta de diagnóstico, podendo ser utilizados de três maneiras possíveis: (1) detecção de anticorpos no soro utilizando o antígeno-alvo, (2) antígenos detectados através do soro que contém anticorpos e a (3) detecção de antígenos utilizando bibliotecas de *scFv* (Shukra et al. 2014).

1.7.2.1 Técnica de exibição de fagos (*Phage display*)

O conceito de exibição de fagos (*i.e.* bacteriófagos), ou de seleção por afinidade, foi introduzido em 1985 por G.P. Smith (Haq et al. 2012). A exposição dos fagos (*scFv*) na superfície de um bacteriófago é conseguido através da inserção de um gene codificador de regiões variáveis de fragmentos de anticorpos no gene estrutural de uma proteína da cápside do bacteriófago. Assim, milhões de fagos são apresentados em forma de partículas fágicas formando uma biblioteca de fragmentos de anticorpos (Smith & Petrenko 1997; Gamkrelidze & Da 2014). Os fragmentos são então selecionados a partir dessas bibliotecas através dos locais alvo biologicamente relevantes na superfície do antígeno-alvo (como por exemplo, sítios ativos enzimáticos ou alostéricos) (Haq et al. 2012; Ja & Roberts 2015)

A maioria das bibliotecas utiliza três tipos de fagos: lítico ou filamentosos ou vetores de fagomídeos (Smith & Petrenko 1997; Krumpe et al. 2006; Gamkrelidze & Da 2014). Os sistemas de exposição mais comuns são baseados em fagos filamentosos em que as regiões variáveis dos fragmentos se encontram fundidas com glicoproteínas de superfície dos bacteriófagos (gpIII e gpVIII). A escolha da proteína de revestimento que transporta os fragmentos da biblioteca de exibição irá determinar a valência que pode variar entre menos do que um e vários milhares de cópias por virião, em média (Gram et al. 1992; Nanduri et al. 2007). Após a captura dos fragmentos de interesse com o antígeno-alvo eluído com a biblioteca, estes são inseridos em uma bactéria para posterior expressão e amplificação das regiões variáveis das cadeias leves e pesadas dos fragmentos específicos ao antígeno-alvo (Hammers & Stanley 2014).

Contudo, vetores como o *pHEN2*, utilizados nesta técnica, não possuem de um código genético completo para codificar e produzir partículas fágicas dentro de *E.coli*. Nestes casos é então adicionado um fago auxiliador (do inglês; *helper*) a *E.coli* que posteriormente irá ser transformado com a biblioteca disposta na superfície do fago. O produto final é uma biblioteca de fagos, cada um a expressar na sua superfície um AcM recombinante (Hammers & Stanley 2014)

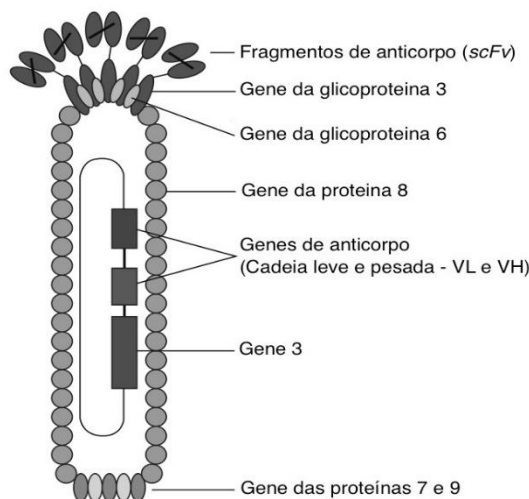
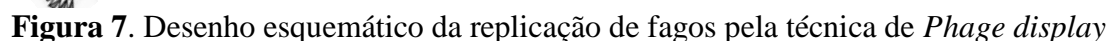


Figura 6. Desenho explicativo do fago filamentosso M13 com *scFv* na superfície, adaptado de(Ahmad et al. 2012)

Fago M13: O fago mais utilizado nesta técnica é o fago filamentosso M13 (Figura. 6), pertencente ao grupo II de fagos com ADN de cadeia simples, de genoma circular fechado. Este fago possui aproximadamente 6500 nucleótidos de comprimento que se agrupam em funções de síntese de ADN do próprio fago, estrutura da cápside e genes de montagem, e pertence à família *Inoviridae*, género *Inovirus*.

Ao contrário da maioria dos fagos, o M13 liga-se a recetores *f-pili*, apêndices sexuais para a conjugação bacteriana também conhecidos como fimbrias de bactérias gram-negativas, *i.e.* *E. coli* macho. Nestes ocorre a codificação genómica através da glicoproteína de superfície III (gp III) e de recetores bacterianos, penetrando assim na célula hospedeira incorporando o seu ADN (Barbas et al. 1991; Fukuda 2012; Lu & Zhu 2014). Neste tipo de mecanismo, o ADN do fago é exposto a partículas virais com o auxílio do fago *helper*, que providencia um conjunto de enzimas e proteínas essenciais para a reprodução do fago. Este fago é modificado com a inserção de um gene que confere

Assim que se atinge um número entre 100 a 200 cópias de partícula fágica, a síntese do fago M13 torna-se assimétrica e produzem-se grandes quantidades de apenas uma cadeia de ADN. No final as partículas fágicas são expelidas por extrusão através da membrana (produto final), sem causarem lise celular (Figura. 7) (Sambrook et al. 2001).



A transferência artificial em laboratório de um determinado plasmídeo para uma bactéria, realizado na fase três do procedimento de *biopanning*, através da infecção pelo fagos recombinante, irá contribuir para a reconstrução do ADN da bactéria, *i.e.*, torná-la resistente a um determinado antibiótico (ampicilina, colocada no vetor) para que haja uma replicação e crescimento preferencial de células (Sambrook et al. 2001).

Produção de fragmentos de anticorpos solúveis: Para a obtenção de um anticorpo recombinante funcional é necessário como produto final uma proteína solúvel, purificada (*scFv* solúveis).

As partículas fágicas obtidas, geralmente, na terceira ronda do *biopanning*, são utilizadas para infectar uma estirpe de *E.coli*, não supressora, HB2151, na sua fase estacionária.

A purificação de *scFv* específicos é realizada através da afinidade da cauda de *histidina* geralmente codificada na extremidade C-terminal da proteína antes do início da codificação da glicoproteína III do fago *Helper* (Lee et al. 2007).

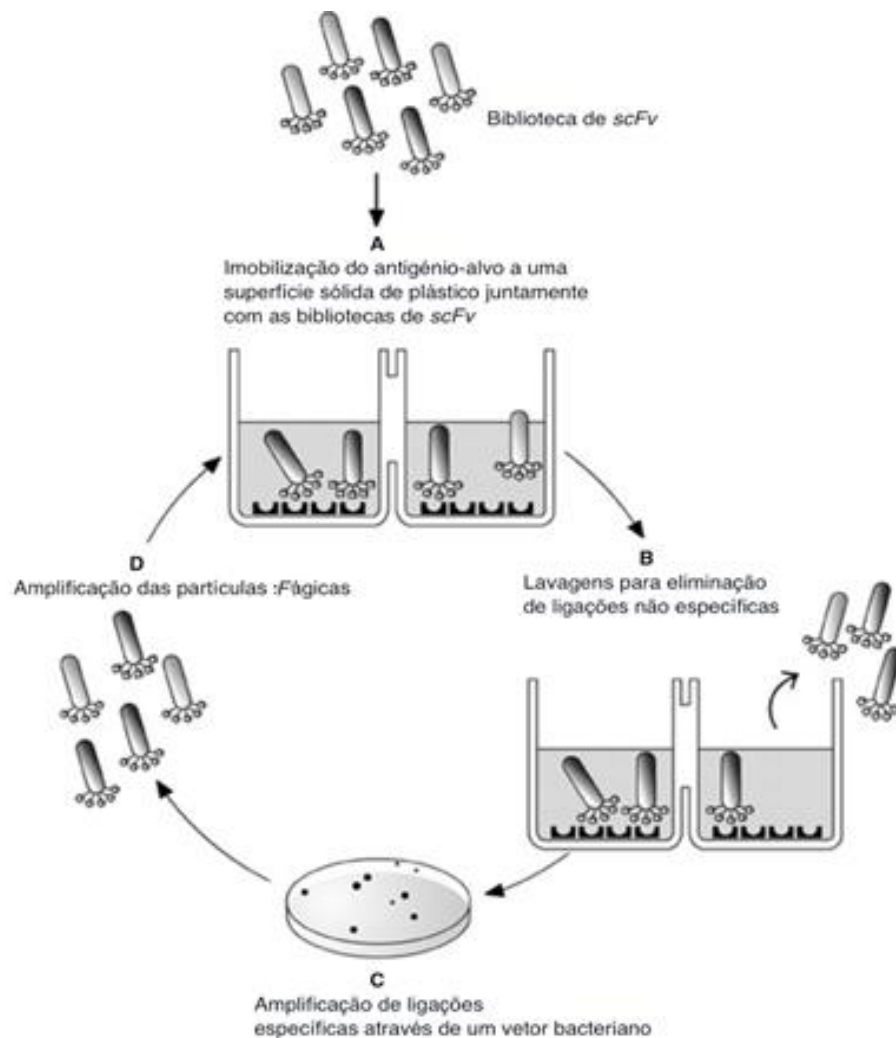


Figura 8. Desenho esquemático das quatro fases do método de *biopanning*. A) imobilização do antígeno-alvo a uma superfície sólida de plástico juntamente com as bibliotecas *scFv*; B) sucessivas lavagens para eliminação de ligações não específicas; C) amplificação de ligações específicas através de um vetor bacteriano; D) amplificação das partículas fágicas, adaptado de (Tonelli et al. 2013).

1

2. Objetivo

2

3

4 **2.1 Objetivo de estudo**

5 O objetivo do presente estudo consiste na produção de anticorpos recombinantes
6 específicos de *P. jirovecii*, com recurso a uma técnica de seleção de anticorpos de
7 bibliotecas de anticorpos por afinidade para aplicar ao diagnóstico da PPc ou
8 pneumocistose.

3. Material e Métodos

3.1 Amostras biológicas

A fim de se pesquisar os anticorpos recombinantes monoclonais específicos para *P. jirovecii* foram realizados três estudos. No primeiro e segundo estudos, a pesquisa dos anticorpos recombinantes fez-se através de amostras biológicas aleatórias de lavados broncoalveolares de doentes com presença de *P. jirovecii*. Para o terceiro estudo foi utilizada uma amostra da proteína recombinante MsgC - Glicoproteína *Major* de superfície (do inglês, *Major surface glycoprotein*) de *P. jirovecii*, a qual é composta por três fragmentos de péptidos imunogénicos (Tomás 2014). Esta sequência foi previamente purificada em cromatografia de IMAC.

Todos os produtos biológicos foram previamente analisados através de vários testes de diagnóstico clínico para averiguação da presença deste patógeno (Esteves et al. 2012; Esteves et al. 2014).

3.2 Metodologias

Para a realização de todo este procedimento experimental foram utilizadas as seguintes metodologias:

3.2.1 Bibliotecas de fragmentos de anticorpos humanos

3.2.2 *Phage-display*

3.2.3 ELISA indireta

3.2.4 Seleção e expressão de partículas fágicas

3.2.5 Seleção e expressão de fragmentos de anticorpos solúveis

3.2.6 Imunofluorescência

3.2.7 PCR

3.2.8 Pré-extração de ADN-plasmídico

3.2.9 Sequenciação

A Figura 9 apresenta um fluxograma com toda a metodologia utilizada no decorrer deste projeto.

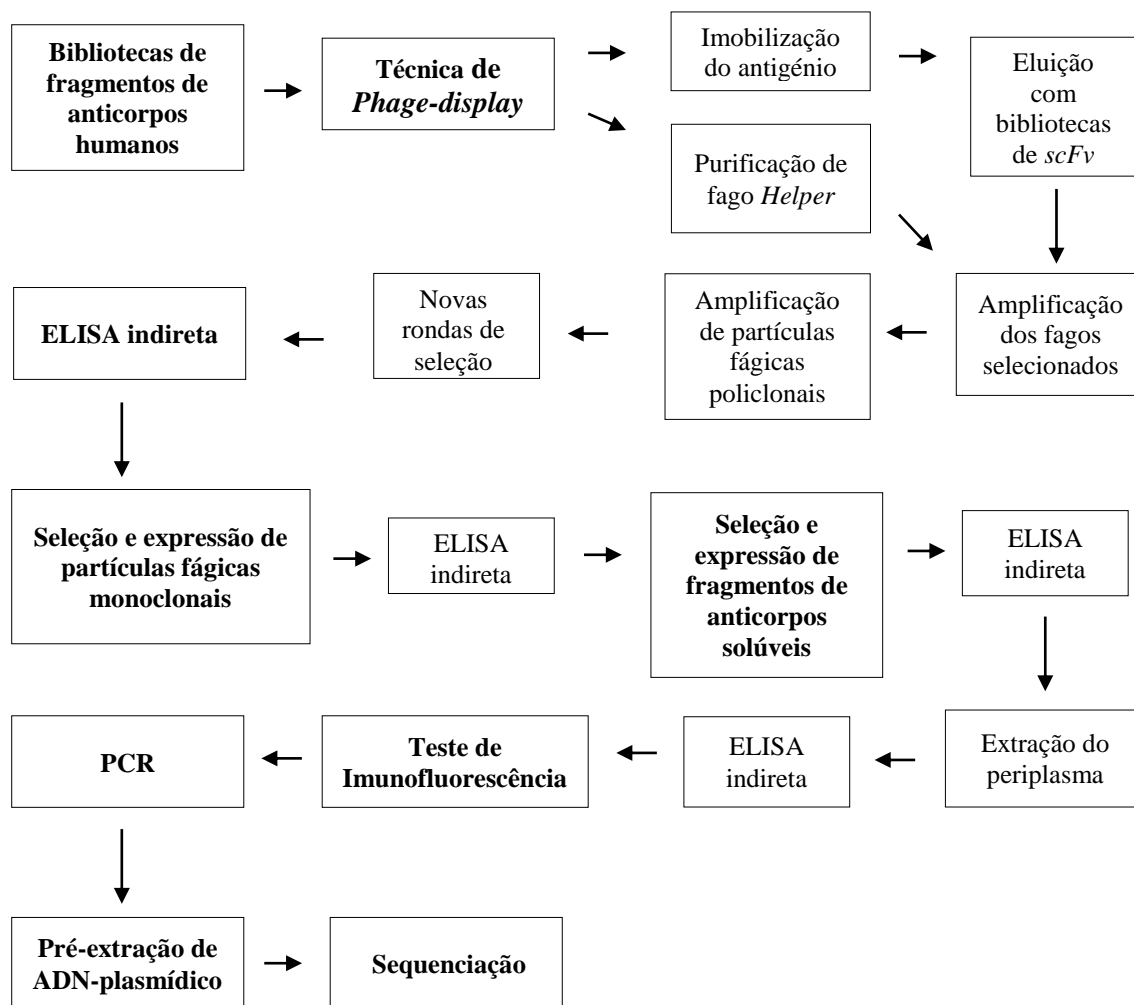


Figura 9. Fluxograma de toda a metodologia utilizada neste projeto.

3.2.1 Bibliotecas de fragmentos de anticorpos

A tecnologia de *Phage display* baseia-se na combinação de várias bibliotecas de fragmentos de anticorpos humanos dispostos na superfície de um fago filamentosos. A captura desses fragmentos é realizada em superfície sólida onde se irá dar uma fusão entre os fragmentos e o antígeno-alvo, produzindo-se fragmentos de anticorpos específicos ao antígeno-alvo. Posteriormente amplifica-se por infecção em bactérias gram-negativas, *i.e.* *E.coli* (Schirrmann et al. 2011). Na fase de obtenção e clonagem dos anticorpos recombinantes para o diagnóstico de *P. jirovecii*, utilizaram-se as estirpes de *E. coli*, *TOP10F* e *HB2151*.

Biblioteca “Griffin. I”, “Tomlinson I” e Tomlinson J”

Neste trabalho foram utilizadas três bibliotecas de fagos denominadas de *Griffith. I.*, *Tomlinson I* e *Tomlinson J* (mapa dos vectores no anexo 1) (McCafferty et al. 1990; Goletz et al. 2002).

A biblioteca *GriffinI.* é uma biblioteca de fagos com fragmentos de anticorpos humanos na sua superfície, e contem um repertório de aproximadamente 1×10^{10} clones, construídos a partir de genes variáveis sintéticos (ver em: <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/vbase-questions.html>). As cadeias leves e pesadas de regiões variáveis de vetores de bibliotecas lox, são reclonadas dentro de vetores de fagos denominados de pHEN2 (ver em: <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/~phage/g1p.html>) (Goletz et al. 2002).

As bibliotecas *Tomlinson I+ J*, clonadas através do vector *pIT2*, contém um repertório de clones de 1.47×10^8 e 1.37×10^8 , respetivamente, sendo clonadas da mesma forma que a biblioteca *GriffinI.* Contudo, estas duas bibliotecas são baseadas em apenas uma sequência de fragmentos de anticorpos humanos (Goletz et al. 2002).

3.2.2 Phage-display

3.2.2.1 Fago auxiliar (*Helper Phage*)

A técnica de seleção de anticorpos por afinidade inicia-se com a purificação de fagos *helper*, MK13, R408 e M13K07, que irão ajudar a fornecer a informação genética necessária para a síntese de proteínas essenciais à formação de partículas virais completas *i.e.* partículas fágicas (Sambrook et al. 2001). Para tal, são utilizadas células de *E. coli TOP10F*, que são competentes, visto o episoma F' ser portador do gene de resistência à tetraciclina e permitir a infeção deste tipo de fagos por conterem o filamento necessário para a infeção.

E. coli TOP10F foi colocada em tubos de crescimento (50mL) com meio Lumia Bertani (LB, Sigma: Triptona 10g/L, Extrato de Levedura 5g/L e NaCl 10g/L) com tetraciclina (10µg/mL), em agitador orbital (Jepo Tech, SK-300, Coreia) com incubadora a 37°C até apresentarem uma densidade ótica (D.O.) de 0.5. A determinação da concentração de *E. coli* no meio de cultura foi realizada pela leitura de absorvância por espectrofotometria 600nm = 0.5 (Abs.600, Jasco, UV/ VIS Spectrophotometer 7800,

Japão). As células foram infectadas com os três tipos de fago *helper* (anteriormente purificado) durante 1 hora a 37°C. Os tubos de crescimento foram colocados em centrífuga a 9000 x g durante 20 minutos a uma temperatura de 4°C (Sigma, 3K15, Alemanha). O sobrenadante foi descartado, o precipitado da cultura de células de *E. coli* foi colocado a crescer em meio LB com canamicina (100µg/mL), para que apenas as células de *E.coli* infectadas com o fago fossem selecionadas. De seguida, foram colocados em agitador orbital a uma temperatura de 37°C a 150 rpm durante 18 horas. Os tubos de crescimento foram centrifugados a 9000 x g à temperatura de 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante, contendo as partículas virais completas, foi isolado para um novo tubo de crescimento (50mL) e adicionado ao volume final 1/5 em Polietileno de Glicol 8000 em meio salino (PEG/NaCl; 2.5 M NaCl) para provocar a precipitação dos fagos, a 4°C durante 4 a 8 horas. Os tubos contendo os fagos precipitados foram centrifugados a 9000 x g, à temperatura de 4°C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em tampão fosfato salino (PBS 1X; 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄). Este último passo foi repetido duas vezes, apresentando um precipitado de coloração branca que posteriormente foi resuspensionado em PBS 1X e quantificado, de acordo com a seguinte fórmula (Mourez & Collier 2004):

$$\text{Viriões/mL} = \frac{(\text{Abs}_{.269} - \text{Abs}_{.320}) \times (6 \times 10^{16})}{9312}$$

Armazenamento: Por fim, os fagos foram armazenados com glicerol 50% a uma temperatura de -20°C, para promover a sua crio-proteção até ao início do método de seleção de anticorpos por afinidade.

3.2.2.2 Imobilização do antígeno em imunotubo

No primeiro estudo de *biopanning* foi incubada uma amostra biológica de lavado broncoalveolar (LBA) positiva para *P. jirovecii* em três imunotubos (Nunc, MaxiSorp) a 4°C durante a noite, para garantir a imobilização do antígeno à superfície sólida (imunotubo de polistireno).

Lavagem: De seguida, todos os imunotubos foram lavados três vezes com PBS 1X. Após as lavagens, foi adicionado 1.5mL de tampão bloqueante, Álcool Polivinil 1% (PVA 1%) em PBS 1X a cada imunotubo, para bloquear qualquer ligação não específica e colocados a incubar à temperatura ambiente durante 1 hora.

3.2.2.3 Eluição com bibliotecas de *scFv*

Descartou-se a solução PVA 1% e adicionou-se a cada imunotubo respetivo uma biblioteca: Biblioteca VL de *scFv* (Biblioteca *Griffith 1*) e Bibliotecas *scFv* J e I (*Tomlinson I + J*) (Goletz et al. 2002) diluídas (1:10) numa solução de PBS-*Tween* e PVA 1% e colocadas a incubar durante 1 hora a 37°C. Este passo permitiu uma seleção primária de anticorpos contra o antígeno alvo (*P. jirovecii*). Efetuaram-se 10 lavagens sucessivas com tampões salinos (PBS-*Tween*, PBS1X estéril e PBS-*Tween* com 500 mM NaCl) PBS-*Tween* (500mM NaCl com pH=5, PBS10X, ddH₂O (Cardoso, 2012)) para remoção de ligações não específicas e, por fim, lavou-se mais três vezes com PBS 1X estéril.

3.2.2.4 Amplificação dos fagos selecionados

Inoculou-se cada um dos imunotubos com 1mL de *E. coli TOP10F*, apresentando D.O. de 600nm = 0.5, crescida em meio de cultura LB suplementado com tetraciclina 10µg/mL, e colocados a incubar durante 1 hora à temperatura de 37°C, sem agitação.

Do total de células, 500µL foram conservadas em 20% de glicerol a -80°C, para posteriormente serem utilizadas. Aos restantes 500µL foram adicionados 15mL de meio LB suplementado com ampicilina (100µg/mL), glucose 1% (1% de glucose em ddH₂O) para bloquear a expressão de proteínas recombinantes tóxicas às células de *E.coli* e, MgCl₂ 1mM. Estas foram colocadas a crescer em agitador orbital à temperatura de 30°C até apresentarem D.O. igual a 0.5, confirmada por espectrofotometria.

3.2.2.5 Amplificação de partículas fágicas policlonais

As células foram infetadas com $2,345 \times 10^{13}$ (medidas em TECAN®, Infinite M200 pro NanoQuant, Suíça, espectrofotometria), partículas fágicas de fago *helper* MK13 mantido em *stock* e anteriormente purificado, colocadas em incubadora a 37°C durante 1 hora. Cada tubo (3) foi centrifugado a 5000 x g durante 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e ressuspensando-se as células em 40mL de meio LB suplementado com ampicilina (100µg/mL), canamicina (100µg/mL), glucose 1% e MgCl₂ 1 mM. Estes foram colocados a crescer à temperatura de 30°C, durante 18 horas, em agitador orbital, para expressão de fagos recombinantes.

O sobrenadante foi recuperado por centrifugação a 9000 x g à temperatura de 4°C durante 20 minutos, contendo as partículas virais completas e colocou-se em novos tubos. Ao sobrenadante adicionou-se 1/5 do seu volume em PEG/NaCl, de forma a provocar a precipitação dos fagos a 4°C durante 4 a 8 horas. Foram novamente submetidos a centrifugação, 9000 x g à temperatura de 4°C, durante 20 minutos, e o precipitado ressuspenso em PBS 1X.

3.2.2.6 Novas rondas de seleção

O protocolo da técnica de *biopanning* repetiu-se por mais duas vezes, utilizando os fagos purificados no *biopanning* anterior, diluídos de 1/10, e utilizados no seguinte, como biblioteca de forma a obter-se uma seleção de anticorpos policlonais com um elevado grau de especificidade ao antígeno alvo.

Por fim, verificou-se a quantidade de viriões por mL através de espectrofotometria em todos os produtos finais de cada *biopanning* referentes a cada uma das bibliotecas amostradas:

$$\text{Viriões/mL} = \frac{(\text{Abs}_{.269} - \text{Abs}_{.320}) \times (6 \times 10^{16})}{9312}$$

Armazenamento: Os fagos de cada *biopanning* foram armazenados com glicerol 50% a uma temperatura de -20°C, até ao início do método de seleção de anticorpos por afinidade

3.2.2.7 Bioseleção com anticorpo anti-quisto de *P. jirovecii*

No segundo estudo foi realizada uma nova estratégia de seleção de fagos específicos por *biopanning* com apenas a biblioteca *Griffin1*. Foi utilizado um método de captura com anticorpos monoclonais Anti-quistos do Monofluo®Kit de *P. jirovecii* (Bio-Rad) com uma amostra de LBA submetida a incubação nos imuntubos de poliestileno. Depois seguiu-se o mesmo protocolo de *biopanning* do antígeno anterior.

3.2.2.8 Bioseleção com Glicoproteína Major de superfície de *P. jirovecii* – MsgC

Através de estudos anteriormente realizados, pôde-se verificar que a MsgC de *P. jirovecii* possui potencialidade de aplicação no diagnóstico imunológico. Por exemplo,

Blount et al. em 2012 encontrou títulos anti-MsgC nos anticorpos em doentes com PPc (Blount et al. 2012). Com base nisto, no terceiro estudo realizou-se novamente a técnica de seleção de anticorpos por *biopanning*, utilizando como antígeno a proteína recombinante (MsgC), clonada e purificada. Neste protocolo utilizou-se a biblioteca *Griffin 1*, para a seleção de anticorpos recombinantes com o auxílio dos três fagos *helper* (MK13, R408 e M13K07) obtendo-se como resultado final nove *biopannings*, três rondas de seleção para cada *helper* e a recuperação de anticorpos recombinantes.

3.2.3 ELISA indireta

O ensaio de ELISA (do Inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (Daly et al. 2004) indireta, baseia-se na interação antígeno-anticorpo por reações enzimáticas, que posteriormente irão ser detetadas pela adição de um segundo anticorpo anti imunoglobulinas (Anti-Ig), ligado a uma enzima, por exemplo, a Fosfatase Alcalina, denominada conjugado. Ao adicionar-se o substrato apropriado para a enzima, dar-se-á uma reação cromática, que permite averiguar a ligação antígeno-anticorpo (Schirrmann et al. 2011).

O protocolo de ELISA consistiu em: colocar 50µL de antígeno, anteriormente diluído (2µg/mL) em 50mM bicarbonato de sódio pH 8.4 , deixando incubar 1 hora a 37°C, seguiu-se uma lavagem em PBS 1X e adição do bloqueante PBS-*Tween*, 70µL por poço e deixou-se incubar durante 1 hora à temperatura ambiente. Colocaram-se todos os fagos dos *biopannings* realizados, diluídos 1:10 em PBS-*Tween*, 50µL por poço à temperatura ambiente durante 1 hora. No Anexo 2 é possível visualizar-se as absorvâncias medidas em *nanodrop* (ThermoScientific), de todos *biopannings*, assim como a quantidade utilizada por cada um no processo de ELISA indireta. A placa de ELISA foi lavada três vezes com tampão de lavagem PBS-*Tween*, seguindo-se a adição de 50µL, por poço, de antifago (Sigma: ANTI-fd BACTERIOFAGO RABBIT 1mL) diluído (1:1500) em PBS-*Tween* e, incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente. De seguida, lavaram-se, novamente, as placas três vezes com tampão de lavagem PBS-*Tween*, e adicionou-se 50µL, por poço, de conjugado anti-coelho (Sigma: ANTI-RABBIT IgM 1mL) diluído (1:10000) em PBS-*Tween*, deixando-se incubar 1 hora à temperatura ambiente. Repetiram-se mais três lavagens com tampão PBS-*Tween* e mais uma quarta lavagem com água. Adicionou-se a cada poço 50µL de substrato (4 Nitrofonil-fosfato)

diluído 1mg/mL em tampão de substrato (10mM de Dietanolamina, pH 9,6, suplementado com 2mM de MgCl₂ e) e deixou-se incubar durante a noite a uma temperatura de 4°C. Por fim, mediram-se as absorvâncias (a 405nm) em espectrofotometria, para seleção do fago recombinante com maior absorvância. Através da Figura 10 é possível observar-se passo a passo de todo o processo de ELISA indireta.

3.2.4 Seleção e expressão de partículas fágicas monoclonais

Após a seleção de fagos recombinantes através do teste de ELISA indireta, prosseguiu-se para a produção de fragmentos de anticorpos específicos ao antígeno-alvo.

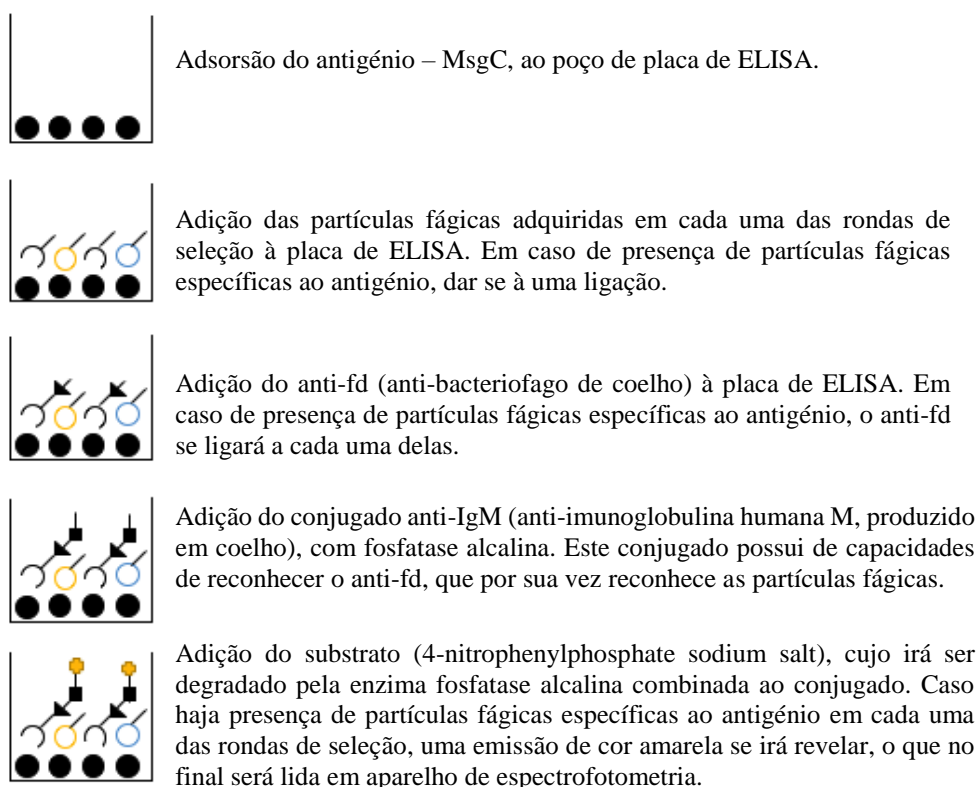


Figura 10. Imagem ilustrativa do método de ELISA indireta para seleção dos *biopannings* na presença de antígeno MsgC.

A produção de *scFv* com afinidade e especificidade ao antígeno em uso foi realizada com o auxílio da estirpe bacteriana: *E.coli TOP10F*. Este processo iniciou-se com diluições seriadas das partículas fágicas de cada *biopanning* 1:100 (até 10⁸) em PBS

1X, a fim de se obter a produção de colónias individualizadas. Inocularam-se os 100µL de cada diluição em 100µL de *E. coli TOP10F*, previamente crescida em meio LB suplementado com 10µg/mL de tetraciclina, incubadas à temperatura de 37°C até apresentarem D.O. de 0.5. Após breve centrifugação de cinco minutos a 300 x g, verteu-se 50µL de cada diluição para as respectivas placas de *petri*, contendo meio LB agar suplementado com ampicilina (100µg/mL), tetraciclina (10µg/mL), glucose 1% e MgCl₂ 1mM, incubando-as durante a noite à temperatura de 37°C. Após a obtenção de colónias isoladas em placa de *petri*, referentes a clones de fagos-anticorpos monoclonais, as colónias foram repicadas para placas de cultura de células em meio sólido de 96 poços (para posterior manuseamento) e para meio líquido, ambos suplementados com ampicilina (100µg/mL), glucose 1% e MgCl₂ 1mM. No final do processo, incubaram-se ambas as culturas à temperatura de 37°C durante a noite.

As placas contendo meio de cultura sólido foram armazenadas a -80°C com uma solução de meio de congelação (meio LB + 50% glicerol) em cada poço. Às placas em meio líquido adicionou-se uma solução de meio LB, ampicilina (100µg/mL) e fago *helper* (2,345x10¹³/mL em 40mL) em cada poço deixando incubar 1 hora a 37°C. As placas foram centrifugadas a 300 x g durante 10 minutos descartando-se, o sobrenadante. Em cada poço colocou-se mais 100µL de uma solução de meio LB com canamicina (100µg/mL), ampicilina (100µg/mL) glucose 1% e MgCl₂ 1mM, deixando-se a incubar em agitação a 30°C, durante a noite.

As placas foram novamente centrifugadas a 300 x g a 4°C durante 10 minutos, armazenando-se o sobrenadante a uma temperatura de 4°C.

3.2.4.1 ELISA indireta

Os sobrenadantes obtidos em 3.2.4 foram submetidos a teste ELISA indireta, para validação da especificidade dos clones para o antígeno-alvo. Neste procedimento foi utilizado o mesmo protocolo transcrito em 2.2.3.

3.2.5 Seleção e expressão de fragmentos de anticorpos solúveis

Para a obtenção dos fragmentos solúveis de anticorpos (*scFv*) foram utilizadas bactérias *E. coli HB2151* devido a estas não serem supressoras do codão de terminação

lac [K12,ara, D (lac-pro), thi/F'proA+B+, lacIqZDM15], podendo expressar anticorpos monoclonais solúveis (Carter et al. 1985). Colocou-se a crescer *E.coli HB2151* em tubos de crescimento com 10mL de meio LB e 100µg/mL de ácido nalidixíco e, deixou-se a incubar à temperatura de 37°C até apresentar D.O igual a 0.5. Prepararam-se placas de cultura de células com meio LB suplementado com ácido nalidixico 100µg/mL, ampicilina 100µg/ml, glucose 1% e MgCl₂ 1mM, adicionando-se 100µL de cultura de células de *E.coli HB2151* a cada poço. Cada poço foi infetado com 5µL do sobrenadante da cultura de *E. coli TOP10F* (adquirido em 4.2.4), com fago proveniente da bioseleção (apenas dos clones previamente selecionados com maior absorvância medida em espectrofotometria) e incubadas durante 1 hora a 37°C. Centrifugaram-se as placas de cultura de células a 300 x g durante 10 minutos e descartaram-se os sobrenadantes. Colocou-se novo meio LB (100µL por poço) suplementado com ampicilina (100µg/ml) e 100µg/mL de ácido nalidixíco (para eliminar a estirpe *E.coli TOP10F*), glucose 1%, MgCl₂ 1mM e propílicos β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG 1mM), que provoca a transcrição do operão *lac*, e é, por conseguinte, utilizado para induzir a expressão da proteína *scFv* solúvel pretendida. Por fim, colocaram-se a incubar a 30°C, com agitação durante a noite (protocolo baseado em: http://www.protocol-online.org/forums/uploads/monthly_09_2010/msg-7402-03086000_%201285307725.ipb, agosto, 2014)

3.2.5.1 Extração do periplasma

Após centrifugação das placas durante 10 minutos a 10000 x g, armazenou-se o sobrenadante a 4°C e ressuspendeu-se o precipitado numa solução tampão - TES 1X (0.2M cloridrato de tris -Tris-HCl, 0.5mM ácido etilenodiaminotetracético - EDTA, 0.5M Sacarose, água - H₂O), para criar choque osmótico das células, incubando-as de seguida a 4°C durante uma hora. As placas foram novamente centrifugadas, a 1000 x g, durante 10 minutos e submetidas ao mesmo processo alterando apenas a diluição do tampão TES para 0,25X (protocolo baseado em: http://www.protocol-online.org/forums/uploads/monthly_09_2010/msg740203086000%201285307725.ipb, agosto, 2014). Os sobrenadantes das células de *E. coli HB2151* foram testados em ELISA indireta, de forma a validar não só a expressão do anticorpo recombinante monoclonal pretendido, como também o local de expressão, se no periplasma ou no citoplasma.

3.2.5.2 ELISA indireta

O protocolo de ELISA deste passo foi semelhante ao descrito em 2.2.3, contudo o bloqueante utilizado foi PVA 1%, e o sobrenadante em *E.coli HB2151* contendo os anticorpos foi diluído 30/50 numa solução de PVA 0,1% (diluído em PBS-*Tween*), usou-se o conjugado proteína A – enzima peroxidase (Sigma: Peroxidase A, 1mL) diluído 1:10000 em PBS-*Tween* sem azida de sódio, seguindo-se das mesmas lavagens. Para tampão substrato utilizou-se ABTS (do inglês, 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, C₁₈H₁₈N₄O₆S₄) diluído (0.5mg/mL) em tampão substrato de sulfato de sódio pH=4.2 com 0.3%/mL de peróxido de hidrogénio (H₂O₂), deixando-se atuar durante 30 minutos à temperatura ambiente e lido a 405nm em aparelho de espectrofotometria.

3.2.6 Teste de Imunofluorescência

Através do teste de imunofluorescência é possível comprovar a presença de anticorpos específicos ao antígeno-alvo com o auxílio de uma coloração, fluoresceína, que irá emitir fluorescência quando for exibida uma ligação específica antígeno-anticorpo (Bava et al. 2002). Neste projeto, a fim de se verificar uma ligação específica do anticorpo recombinante adquirido ao antígeno-alvo (*P. jirovecii*), foi seguido o protocolo do MonoFluo® Kit *P. jirovecii* da BioRad®. Primeiramente, foram preparadas em “hotte” química algumas lâminas de Poli-L-lisina (Thermo Scientific; Poly-L-lisine Slides; Alemanha) com um esfregaço de 50µL de antígeno, *P.jirovecii*. As lâminas foram submetidas a uma solução de acetona (CH₃COCH₃) durante 10 minutos em caixa de vidro para coloração. Adicionou-se 50µL de sobrenadante contendo os *scFv* de anticorpos, diluído (1:5) em BSA 0.1% (diluído em PBS1X), a cada uma das lâminas e de imediato incubou-se em câmara húmida durante 30 minutos a uma temperatura de 37°C. De seguida as lâminas foram lavadas com PBS 1X e secas em chapa de aquecimento (Thermolyne, Cimarec 2, E.U.A). Colocou-se 50µL de Anti FD diluído (1:2000) em BSA 1% em cada lâmina e incubaram-se novamente em câmara húmida durante 30 minutos à temperatura de 37°C, seguindo-se o mesmo processo de lavagem e secagem. Pipetou-se 50µL de TRITC (Thermo Fisher: Tetramethylrhodamine – TRITC com rodámid Anti-coelho, 1mL) diluída em BSA 0.1% com Azul de Evans 1% (diluído em PBS-*Tween*) diluído (1:100) em cada lâmina, sucedendo-se de igual modo os passos anteriores de

incubação, lavagem e secagem. Por fim, preparou-se cada uma das lâminas com lamela introduzindo uma gota de reagente de montagem (MonoFluo® Kit *P. jirovecii* da BioRad®) e visualizaram-se a Microscópico de fluorescência a um comprimento de onda de 575nm.

3.2.7 PCR

Os *primers pHEN2 e LMB3* de *scFv Griffith 1* e *Tomlinson I + J*, respetivamente, serviram para verificar a presença da sequência de regiões de cadeia leve e pesada nos anticorpos recombinantes pesquisados (clones selecionados por maior absorvância em teste ELISA). Seguiu-se a amplificação por PCR utilizando *primers* cuja composição de oligonucleótidos está detalhada no quadro 1.

Quadro 1. Composição dos *primers* utilizados para validação da presença da sequência nucleotídica das amostras de partículas fágicas monoclonais utilizadas

Para utilização de cadeia leve e pesada	<i>Primer foward LMB3</i>	5'CAGGAAACAGCTATGAC3'
	<i>Primer reverse pHEN-SEQ</i>	5'CTATGCGGCCCCATTCA3'
	Com excerto	935pb
	Sem excerto	329bp

Na realização desta técnica foi utilizada a mistura reacional redigida no quadro 2, e, a amplificação de ADN foi feita no termociclador *Biometra® 1 Thermocycler*, segundo as condições térmicas descritas no quadro 3.

Quadro 2. Composição da mistura utilizada na amplificação por PCR

Componentes	Volume utilizado
Água livre de RNase	19,94µL
Tampão de sulfato 10X	3µL
MgCl ₂ (25mM)	3.6µL
Mix de dNTPs (10mM)	0.6µL
<i>Primer forward</i> – LMB3 (20µM)	0.4µL
<i>Primer reverse</i> – pHEN-SEQ (20µM)	0.4µL
DNA	2µL
<i>bioTAQ</i> (5U/µL)	0.07µL
Volume total	30µL

Quadro 3. Condições térmicas aplicadas na reação de PCR LongRange para amplificação específica da fração pretendida

Condições de amplificação	Nº de ciclos
Desnaturação 95°C, 2 minutos	1
Desnaturação 95°C, 1 minuto	
Ligação 50°C, 1 minuto	35
Extensão 72°C, 1 minuto	
Extensão 72°C, 5 minutos	

3.2.7.1 Gel de eletroforese

O gel de eletroforese foi efetuado em tina de eletroforese, com 1% de agarose (1g de agarose - *SeaKem LE; FMC BioProducts®*) em 100mL de tampão TAE 1X (TrisAcetato 0,04 M; EDTA 0,001 M; pH 8,3). Após a difusão da agarose e do tampão, adicionou-se 0.5mg/mL de brometo de etídio (Sigma).

3.2.8 Pré-extração de ADN-plasmídico (Miniprep)

Após a identificação da sequência de pares de bases do plasmídio, seguiu-se para a extração do ADN plasmídico utilizando o protocolo *QIAprep Miniprep Kit da QIAGEN®*. Primeiramente, colocou-se a crescer a 37°C sobre agitação colónias isoladas de partículas fágicas monoclonais (clones com maior absorvância medida em espectrofotometria) em 5 mL de meio LB, suplementado com tetraciclina (10µg/mL) até apresentar D.O. = 0,5. De seguida centrifugou-se a cultura de células a 5000 x g durante 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 250µL de tampão P1, transferindo-o para um novo tubo de microcentrifuga. Adicionou-se ao tubo de microcentrifuga mais 250µL de tampão P2 invertendo-o seis vezes. Adicionou-se mais 300µL de tampão N3, invertendo o tubo de microcentrifuga por mais 6 vezes. Centrifugou-se o tubo de microcentrifuga durante 10 minutos a 15400 x g e o sobrenadante foi colocado num tubo de coluna do *kit QIAprep* com o auxílio da micropipeta e submetido a centrifugação a 1300 x g durante 60 segundos, descartando-se, por fim, o sobrenadante. O tubo de coluna de extração do *kit QIAprep* foi lavado com 750µL de tampão PE e submetido a uma centrifugação de 15400 x g durante 60 segundos.

A solução na coluna foi descartada e centrifugada novamente para remover todo o tampão de lavagem.

Para eluição do ADN, colocou-se a coluna de extração dentro de um novo tubo de microcentrifuga (1.5mL) e adicionaram-se 50µL de tampão EB, e seguindo-se nova centrifugação a 15400 x g durante 1 minuto.

3.2.9 Sequenciação

A fim de se realizar a sequenciação dos fragmentos da cadeia de ADN plasmídico purificado, adquirido pelos fagos monoclonais neste estudo, recorreu-se à sequenciação através de um sequenciador ABI 3730XL, feita pela empresa Stabvida®. Esta sequenciação baseia-se no método convencional de sequenciação de Sanger (do inglês; *Sanger-sequenced transducing-units* - TU) o qual permite determinar a sequência exata de uma cadeia de ADN. Este método foi desenvolvido por Frederick Sanger em 1977, já tendo sofrido algumas alterações a nível tecnológico, principalmente para sequenciação de genomas de maior dimensão.

3.2.9.1 Análise de sequências

A análise de sequências foi efetuada através do leitor de sequências do site EMBOSS, onde primeiramente foram colocadas cada uma das sequências vindas da empresa Stabvida® para procura de sequências com semelhança acima dos 96%. A sequência utilizada como controlo foi retirada de um artigo cujo estudo foi também realizado com a biblioteca combinatória de fagos *Tomlinson J* (Cruz et al. 2013) permitindo verificar a presença do vetor dos clones enviados para sequencia.

4. Resultados

4.1 Seleção de partículas fágicas pela técnica de *Phage display*

Com o objetivo de se obterem fagos anti-*Pneumocystis* a partir de bibliotecas combinatórias de *scFv* foram realizados três estudos: no primeiro foram utilizadas as três bibliotecas combinatórias (*Griffith1.*, *Tomlinson J* e *Tomlinson I*), utilizando como antígeno LBA positivo de um doente com PPc. O segundo estudo foi elaborado apenas com a biblioteca *Griffith1.*, LBA infetado com *P. jirovecii* e um anticorpo monoclonal anti-quisto para a captura do antígeno-alvo, o terceiro estudo efetuou-se apenas com a biblioteca *Griffith1.*, usando a proteína recombinante de superfície major – MsgC – de *P. jirovecii* como antígeno.

Durante todo o procedimento de *biopanning*, foram utilizados três fagos *helper*: MK13 em todos os estudos, R408 e M13K07 apenas no terceiro estudo. A Tabela 4 esquematiza os três estudos efetuados com a descrição das bibliotecas, fagos *helper* e número de rondas de seleção de fagos utilizados em cada um dos estudos.

Quadro 4. Resumo do processo de seleção de fagos.

Estudo/ensaio	Antígeno	Biblioteca	Fago <i>helper</i>	Nº de rondas
1	LBA	<i>Griffin 1.</i>	MK13	3
		<i>Tomlinson J</i>		3
		<i>Tomlinson I</i>		3
2	LBA e AcM anti-quisto de <i>Pneumocystis</i>	<i>Griffin 1.</i>	MK13	3
3	MsgC	<i>Griffin 1.</i>	MK13	3
			R408	3
			M13K07	3

4.1.1 Validação da presença de partículas fágicas em cada ronda de seleção efetuada

Após a captura de partículas fágicas policlonais por técnica de *Phage display* com o auxílio do método de *biopanning* procedeu-se à validação da presença de fagos em cada ronda de seleção obtida, através do método ELISA indireta.

Quadro 5. Quadro representativo da presença de partículas fágicas em cada uma das rondas de seleção efetuadas

Estudo/Ensaio	Biblioteca	Biopanning	Fago helper	Presença de fagos:
1	<i>Griffin 1.</i>	1	MK13	✓
		2		✓
		3		x
	<i>Tomlinson J</i>	1		✓
		2		✓
		3		x
	<i>Tomlinson I</i>	1		✓
		2		✓
		3		x
2	<i>Griffin 1.</i>	1	MK13	✓
		2		x
		3		x
3	<i>Griffin 1.</i>	1	MK13	✓
		2		✓
		3		✓
		1	R408	x
		2		✓
		3		✓
		1	M13K07	✓
		2		✓
		3		x

A Tabela 5 apresenta todas as rondas de seleção efetuadas com base nas diferentes bibliotecas selecionadas para cada estudo, incluindo informação relativa à presença ou não de partículas fágicas medidas por espectrofotometria após teste de ELISA. No primeiro estudo pode-se constatar, que apenas as duas primeiras rondas de todas as bibliotecas apresentaram valores positivos para a presença de fagos.

No segundo estudo observa-se que apenas a primeira ronda de seleção de fagos apresenta presença de partículas fágicas, em contraste com as seguintes rondas.

Finalmente, no terceiro estudo relativamente ao fago *helper* MK13, o qual tinha sido utilizado nos outros dois estudos anteriores, existiu presença de fagos em todas as rondas de seleção. O que contrasta com os resultados apresentados no primeiro estudo, onde a terceira ronda de seleção não apresentou presença de partículas fágicas. Em relação ao fago *helper* R408 somente a partir da segunda ronda de seleção começam a ser detetadas partículas fágicas. Por último, com o fago *helper* M13K07 obtiveram-se apenas partículas fágicas nas duas primeiras rondas de seleção, como ocorreu no primeiro estudo. No Anexo 2 é possível observar-se as concentrações de cada ronda de seleção utilizadas na técnica de ELISA.

4.1.2 Seleção de partículas fágicas policlonais obtidas com *Phage display* na presença de um antígeno

Considerando os resultados obtidos na secção anterior, mais especificamente os *biopannings* que revelaram maior absorvância em cada estudo, voltou a utilizar-se o teste de ELISA indireta de modo a validar a presença de partículas fágicas com especificidade para o antígeno-alvo, neste caso utilizou-se o antígeno recombinante MsgC. O gráfico da Figura 11 ilustra as médias das absorvâncias medidas por espectrofotometria em comprimento de onda de 405nm, dos diferentes *biopannings* nos três estudos realizados.

No primeiro estudo é possível observar-se as absorvâncias referentes às ligações antígeno-fago das rondas de seleção de cada biblioteca de fagos recombinantes. Pode-se constatar que todas apresentam valores elevados na presença do antígeno MsgC em comparação com os valores sem antígeno, o que demonstra a seleção de fagos recombinantes com capacidade ligação ao antígeno-alvo.

Analisando os valores de absorvância com e sem antígeno obtidos no segundo estudo, pode-se observar que estes não apresentaram valores diferentes entre si, para além do valor com antígeno ser bastante mais baixo quando comparado com o controlo positivo (com MsgC), neste caso podemos ter ligações não específicas com a seleção de fagos recombinantes que se podem estar a ligar a outras estruturas e não ao antígeno.

Referente ao terceiro estudo, quando analisados os resultados com o fago *helper* MK13, denota-se um incremento nas absorvâncias medidas de ronda de seleção em ronda

de seleção na presença de antígeno, ao contrário do que se sucede sem antígeno. Este caso demonstra que há um aumento da especificidade dos fagos recombinantes selecionados em cada ronda. As rondas de seleção com fago *helper* R408 e M13K07 não apresentaram resultados conclusivos, uma vez que não existem diferenças nas absorvâncias na presença e ausência de antígeno, apesar dos valores da terceira ronda de seleção com *helper* R408 serem superiores aos das restantes rondas com ambos os fagos.

O gráfico da Figura 11 indica que apenas com o fago *helper* MK13 se conseguiu obter fagos recombinantes específicos para o antígeno recombinante MsgC, o que não aconteceu quando se utilizou outros fagos *helper*.

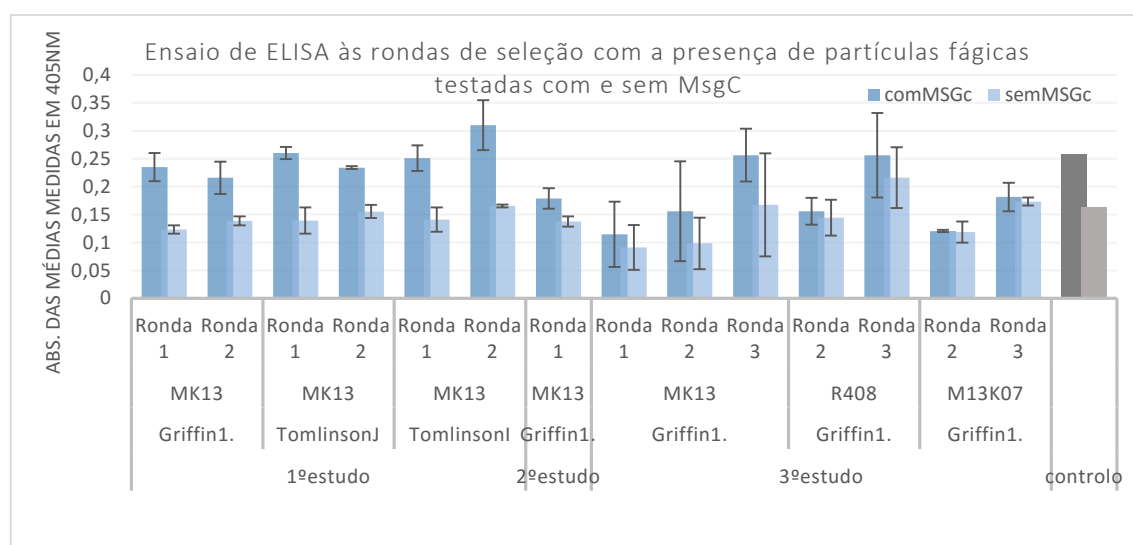


Figura 11. Médias das absorvâncias, e respetivo desvio padrão, medidas por espetofotometria (405nm) de todas as rondas de seleção com partículas fágicas, dos três estudos, testadas na presença e ausência de antígeno - MsgC.

Conseguiu-se obter fagos recombinantes, que foram inicialmente selecionados num LBA positivo para a PPc e que dentro desse LBA se encontra a MsgC visto que se conseguiu fagos recombinantes com capacidade de se ligarem à *Msg* recombinante.

4.1.3 Seleção de partículas fágicas policlonais obtidas em *Phage display* na presença de três antígenos

Após uma análise ao gráfico da Figura 11, e para se fazer uma triagem das rondas efetuadas selecionaram-se quatro rondas. A seleção destas rondas baseou-se na diferença entre absorvâncias de ELISA a um comprimento de onda de 405nm que se apresentavam

com e sem antígeno (MsgC). Refletindo uma maior quantidade de ligações antígeno-fago, em comparação com as amostras sem antígeno.

Para constatar a obtenção de fagos recombinantes anti MsgC recombinante, obtidos durante a seleção para a mistura de *pool* de antígenos de amostras com PPc, realizou-se novo teste ELISA indireta (Figura 12). Assim, neste caso o ensaio foi realizado na presença de dois antígenos de *P. jirovecii* distintos (MsgC e *pool* de LBA positivos para *P. jirovecii*) e *pool* de amostras de LBA negativos para *P. jirovecii*.

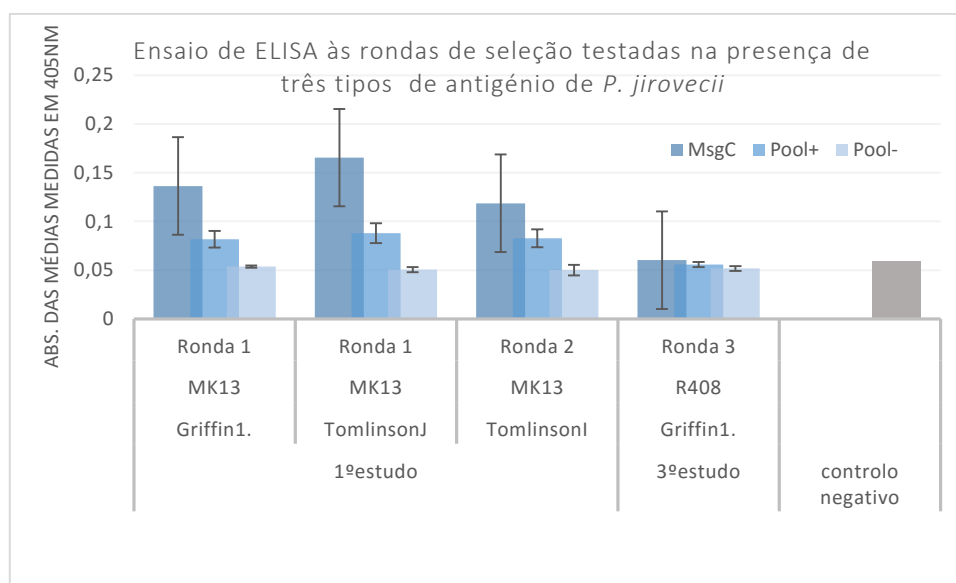


Figura 12. Médias das absorvâncias, e respetivo desvio padrão, medidas em espectrofotometria no comprimento de onda de 405nm de todas as rondas de seleção com partículas fágicas, dos três estudos, testadas na presença de dois antígenos de *P. jirovecii* (MsgC e *pool* de amostras de LBA positivas para PPc) e uma *pool* de amostras negativas para PPc.

Como se observa no gráfico da Figura 12, houve a seleção de fagos recombinantes para a *pool* positiva quando se utilizou o fago *helper* MK13, por outro lado com o fago *helper* R408 não se obtiveram fagos recombinantes. Conseguiram-se obter fagos para os antígenos testados, MsgC recombinante e para a *pool* positiva. O que demonstra que o método de seleção utilizado se apresenta como eficaz na seleção de fagos recombinantes, conseguindo-se diferenciar a *pool* positiva da *pool* negativa. Nesta mistura de clones de fagos recombinantes (policlonais), existem clones que são específicos para a MsgC recombinante. Por fim, os valores obtidos na ronda de seleção da biblioteca *Griffin 1.* do terceiro estudo com o fago *helper* R408 não apresentaram absorvâncias diferentes na

presença dos antígenos em estudo, apresentando valores semelhantes ao do controlo negativo.

Com base nos resultados obtidos no gráfico da Figura 12, seleccionaram-se para a fase seguinte – Seleção e expressão de partículas fágicas monoclonais – as variáveis seguintes: Rondas 1 da biblioteca *Griffith1*. e Ronda 1 da biblioteca *Tomlinson J* do primeiro estudo, por possivelmente conterem a partícula fágica de interesse.

4.1.4 Expressão e seleção de partículas fágicas monoclonais

Utilizando a seleção dos *biopannings* em 4.1.3, prosseguiu-se para a expressão de partículas fágicas monoclonais, através da infeção de células de *E. coli TOP10F*.

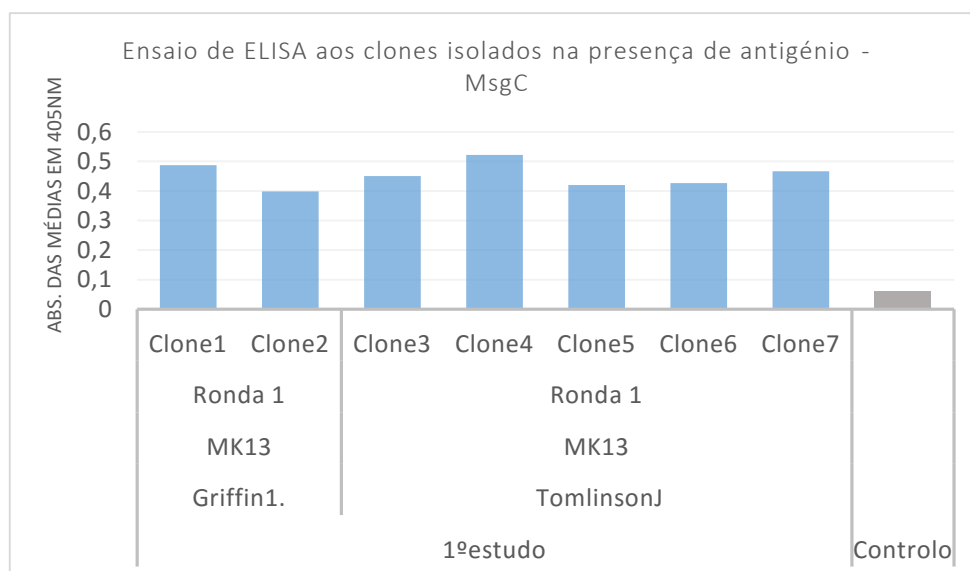


Figura 13. Médias das absorvâncias medidas em espectrofotometria no comprimento de onda de 405nm dos clones isolados selecionados com partículas fágicas monoclonais, testadas na presença de antígeno - MsgC.

Noventa e dois clones (46 da biblioteca *Griffin 1*. e 46 da biblioteca *Tomlinson J*) isolados e analisados através de ELISA indireta na presença do antígeno MsgC. Dos 46 clones isolados da biblioteca *Griffin 1*. apenas foram selecionados dois clones (Clones 1 e 2, Figura 13) com base nos valores das absorvâncias (superiores a 0,3UA). Quanto à biblioteca *Tomlinson J*, dos 46 clones isolados apenas foram considerados cinco (Clones 3, 4, 5, 6 e 7, Figura 13) com base no mesmo critério de seleção.

Apesar da escolha de cada clone ter sido baseada em absorvâncias superiores a 0,3 UA, destaca-se que alguns clones apresentam absorvâncias superiores aos restantes. Por exemplo, os Clones 1 e 4 expressos pelas bibliotecas *Griffin 1.* e *Tomlinson J*, respetivamente, apresentaram os valores mais elevados dos 92 clones testados.

Os clones selecionados (Figura 13) foram testados de novo em ELISA indireta, para determinar a sua capacidade de se ligarem ao antígeno MsgC, bem como à *pool* de amostras de LBA de doentes positivos e negativos para PPc. Como se pode observar no gráfico da Figura 14, os Clones 1 e 2 não apresentaram resultados diferentes nas respostas obtidas. Os resultados para os Clones 3, 4, 5 e 6 apresentaram um padrão semelhante nos valores de absorvância para a presença do antígeno MsgC (mais elevados) quando comparados com os valores para a *pool* de amostras positiva. Como Clone 7, os resultados assemelham-se aos obtidos com os Clones 1 e 2 da biblioteca *Griffin 1.*, não existindo diferenças entre o antígeno MsgC e as *pool* de amostras positivas e negativas de LBA.,

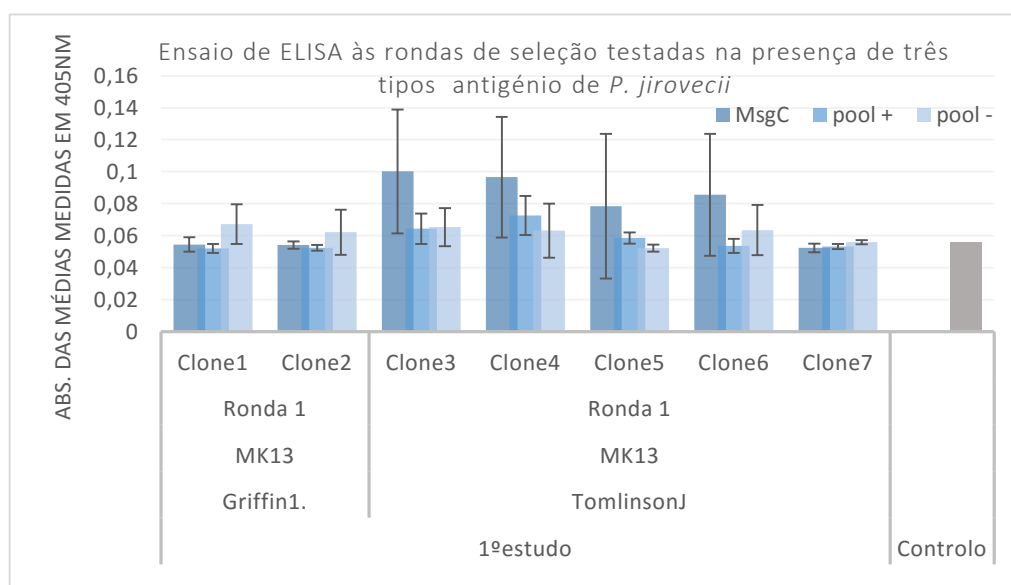


Figura 14. Médias e respetivo desvio padrão das absorvâncias medidas em espectrofotometria no comprimento de onda de 405nm dos clones isolados outrora selecionados com partículas fágicas monoclonais, testadas na presença de dois antígenos de *P. jirovecii* (MsgC e *pool* de amostras de LBA positivas para PPc) e uma *pool* de amostras negativas para PPc.

Deste modo, foram selecionados os clones 3, 4, e 5 para a expressão de fragmentos de anticorpos solúveis em *E.coli HB2151* –devido aos valores de absorvâncias se terem revelado altos na presença do antígeno MsgC.

4.1.5 Seleção e expressão de fragmentos de anticorpos solúveis

De modo a testar os anticorpos monoclonais recombinantes, prosseguiu-se para o protocolo de expressão de fragmentos de anticorpos solúveis utilizando os três clones selecionados anteriormente.

Com base na bibliografia estudada, para realizar a expressão de fragmentos solúveis foi necessário utilizar os sobrenadantes de *E. coli TOP10F*, adquirido em cada um dos três clones, contendo as partículas fágicas recombinantes. Estes sobrenadantes foram então utilizados para infectar a estirpe de *E. coli HB2151*. Esta estirpe foi utilizada porque apresenta a característica de não ser supressora do codão de terminação [K12,ara, D (lac-pro), thi/F'proA+B+, lacIqZDM15], podendo expressar fragmentos de anticorpos solúveis (Carter et al. 1985). A expressão destes fragmentos pode ocorrer em duas zonas distintas das células de *E.coli*, dentro ou fora do periplasma. De modo a determinar o local de expressão realizou-se o método de choque osmótico às células bacterianas, tendo de seguida se realizado um teste de ELISA indireta com o sobrenadante antes e depois do choque osmótico.

O teste de ELISA indireta a ambos os sobrenadantes, no citoplasma e no periplasma, foi inconclusivo visto não se ter observado qualquer reação no teste ELISA, sendo mais provável não ter existido expressão dos anticorpos recombinantes.

4.2 Isolamento do ADN plasmídico dos clones selecionados

Finalizado o processo de transformação das bactérias, era necessário confirmar-se a presença do vetor para posterior utilização na PCR e sequenciação, de modo a confirmar a presença do fragmento de *scFv*. Deste modo, realizou-se a purificação do ADN plasmídico de cada um dos três clones, 3, 4 e 5 citados na alínea 4.1.4, em *E. coli TOP10F.*, com o auxílio do protocolo *Miniprep Kit* da QUIAGEN. O gel de eletroforese apresenta os vectores selecionados não digeridos de cada um dos três clones (Figura 15).

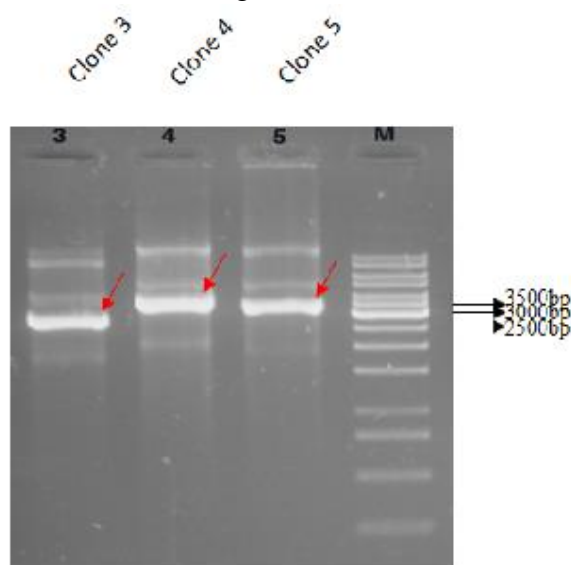


Figura 15. Fotografia dos resultados da reação da purificação do ADN plasmídico de três colónias de *E.coli TO10F* contendo partíulas fágicas monoclonais transformadas com o vetor *pHEN2* para a produção dos três clones selecionados anteriormente em gel de eletroforese. Na fotografia encontra-se representado o marcador de peso molecular 1k pb (M), Clone 3, Clone 4 e o Clone 5. As bandas representadas atingem os valores da presença de mais de 1000 pb por ADN plasmídico.

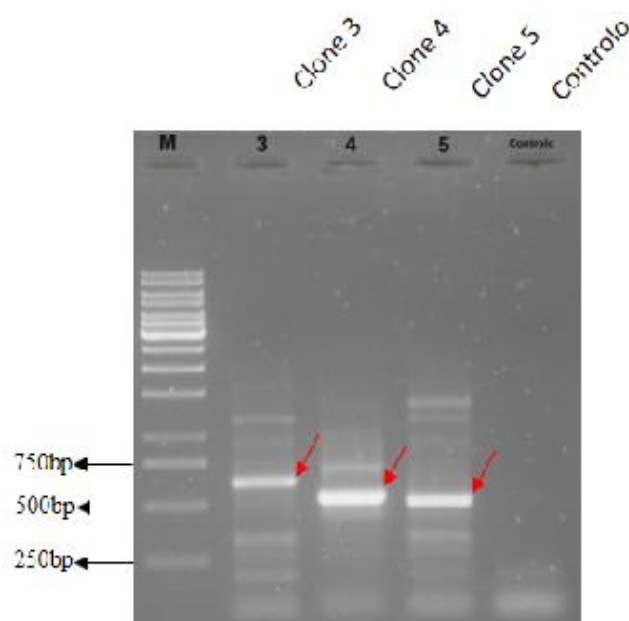


Figura 16. Fotografia dos resultados da reação de PCR para validação da presença de anticorpos recombinantes em três dos clones selecionados anteriormente e do controle em gel de eletroforese. Na fotografia encontra-se representado o marcador de peso molecular 1k pb (M), Clone 3, Clone 4 e o Clone 5. As bandas representadas atingem os valores entre 550 a 750 pb em cada um dos resultados.

Os três clones selecionados foram, também, testados por PCR. O gel com os resultados desta reação de PCR está representado na Figura 16. Os clones apresentam uma banda entre os 550 bp e os 750 bp tal como o descrito em (Cruz et al. 2013), simbolizando a presença de *scFv*.

Os Clones 3, 4, e 5, foram também sequenciados e a composição nucleotídica obtida por sequenciação. No entanto, só foi possível determinar a sequência para o Clone 4 (Figura 17). O seu conteúdo foi alinhado através do site EMBOSS, apresentando uma semelhança de 96% com outra sequência outrora sequenciada e com a presença não só de aminoácidos representativos de cadeias de regiões variáveis de anticorpos recombinantes (ver Figura 17), como também possibilitou verificar a presença do ADN plasmidico ao qual os clones foram submetidos a clonagem, através das caraterísticas *Linker* e Histidinas. O método de sequenciação também possibilitou responder à questão da não expressão de anticorpos recombinantes neste projeto, devido à presença de um codão ambar de terminação extra (Cruz et al. 2013).

```

>Seq_Clone4
MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR
                                CDR 1 (CH)                                CDR 2 (CH)
QAPGKGLEWVSTIYV*GNATFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
                                CDR 3 (CH)          Linker          CDR 1 (CL)
RPPLFDYWGGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGTDTIOMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS
                                CDR 2 (CL)
QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY
                                CDR 3 (CL)
YCOOSYSTPNTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHHHGAAEQKLI SEEDLNCAA*

```

Figura 15. Sequência de aminoácidos deduzida das sequências nucleotídicas do site EMBOSS. As CDR1-3 representam as regiões determinantes complementares dos domínios das cadeias leves e pesadas. *Linker* e histidina (H) representam características da presença do vetor plasmídico.

4.3 Seleção de partículas fágicas monoclonais por teste de Imunofluorescência

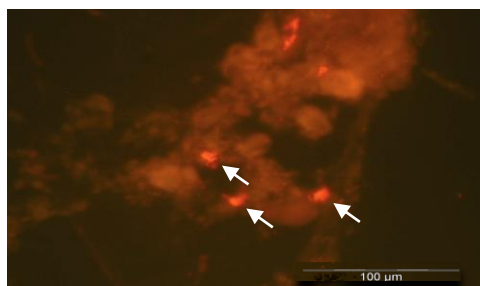


Figura 16. Ensaio de imunofluorescência: Partícula fágica monoclonal (clone 5) utilizado como primeiro anticorpo neste ensaio, seguido da adição do Anti-FD e de TRITC anti-coelho, para detecção do antígeno *P. jirovecii*. Ampliação= x40; Escala= 100µm.

Embora o método de expressão de fragmentos de anticorpo em *E. coli* HB2151 não tenha apresentado resultados conclusivos, prosseguiu-se para a utilização das partículas fágicas monoclonais selecionadas em 4.1.4, na realização de teste de diagnóstico de imunofluorescência em amostras de LBA positivos e negativos para *P. jirovecii*. Apenas o clone 5 da Figura 14, (pertencente à ronda de seleção 1 da biblioteca Tomlinson J do 1º estudo) testado em IFI detetou formas parecidas com quisto de *P. jirovecii* (Figura 18). Contudo, não foi possível a confirmação inequívoca da presença destes quistos nas lâminas observadas em microscopia de fluorescência.

5. Discussão e conclusão

5.1 Seleção e expressão de regiões variáveis de fragmentos de anticorpos.

Como tem vindo a ser descrito ao longo de vários estudos, a pesquisa de anticorpos por técnica de *phage display*, tem sido uma mais valia significativa para novas abordagens não só de diagnóstico, como é descrito ao longo deste projeto, como também para vacinas e novas terapêuticas (Gupta et al. 2015; Järvinen et al. 2015; Cheng et al. 2015). Uma das principais vantagens na utilização desta técnica recai no facto de não se ter de recorrer à imunização animal, oferecendo um hibridoma à disposição em fagos em forma de biblioteca combinatória (Skena 2005). Não se limita apenas a um só antígeno, péptido, vírus, etc, possui um grande leque de possibilidades. A este leque vasto deve-se o facto da biblioteca ser construída por fragmentos de regiões variáveis de anticorpos humanos, possibilitando uma afinidade fragmento (região variável) - antígeno mais elevada (Ag & Strasse 2011). O reconhecimento das moléculas é automático, sem ser necessária “apresentação” (Cristina & Brás 2012). O armazenamento a longo prazo é mais viável do que o armazenamento de hibridomas *in vivo* (Ahmad et al. 2012). O custo é menor, o isolamento e a expressão mais rápidos, sendo todo o material obtido como produto final de fácil manipulação (Ahmad et al. 2012).

Posto isto, o presente estudo teve como principal objetivo a captura de fragmentos de anticorpos para o diagnóstico da PPc recorrendo à técnica de *Phage display*.

5.1.1 Seleção e expressão de regiões variáveis de fragmentos de anticorpos utilizando como antígeno lavado broncoalveolar

Numa primeira abordagem, foi realizado um ensaio utilizando-se como antígeno, na fase de captura de fragmentos com três bibliotecas distintas, um LBA de um doente aleatório com PPc. A decisão da utilização de uma amostra de um doente baseou-se no facto de ser impossível cultivar *P. jirovecii* (Morris & Norris 2012). Nesta primeira fase, foram realizadas nove rondas de seleção, três para cada biblioteca, com o intuito de encontrar a partícula fágica de interesse principalmente na última ronda. De modo geral, quando se utiliza a técnica de *Phage display* é necessária a realização de três rondas de

seleção (Goldman & Green 2015). No presente estudo e face aos resultados obtidos, constata-se uma situação diferente. Não se observaram partículas fágicas na última ronda nas três bibliotecas de *scFv* utilizadas. No entanto, conseguiu-se obter partículas fágicas logo na primeira ronda de seleção. Este resultado demonstra que o protocolo utilizado consegue isolar clones de interesse, logo na fase inicial de seleção, ao contrário dos outros métodos descritos em que apenas na terceira ronda se obtém os clones de interesse. Sem embargo, alguns estudos indicam que o facto de não se terem encontrado partículas fágicas na última ronda das três bibliotecas pode decorrer de um problema durante as lavagens; no decorrer do processo de *biopanning* podem-se ter perdido partículas fágicas durante o procedimento das lavagens, onde ligações não específicas permanecem (Mandecki et al. 1995). Uma das desvantagens da utilização desta técnica, é o facto de ocorrerem ligações inespecíficas recorrentes (Rondot et al. 2001).

As rondas em continuidade, em que se verifica a presença de fagos no primeiro ensaio de ELISA indireta, Rondas 1 e 2 de *Griffin 1*, *Tomlinson J* e *Tomlinson I*, foram novamente submetidas ao teste ELISA indireta. Agora para verificação da presença de fagos correspondentes ao antígeno MsgC. Apenas as Rondas 1 das bibliotecas *Griffin 1*, e *Tomlinson J*, e a Ronda 2 da *Tomlinson I* apresentaram valores expressivos, simbolizando ligações específicas antígeno-fago. A fim de se verificar qual a ronda mais promissora para a obtenção dos clones, estas três rondas de seleção foram novamente submetidas ao teste ELISA; agora para verificação da especificidade das suas ligações na presença não só do antígeno MsgC como também de uma *pool* de LBA positivos para *P. jirovecii* e outra *pool* de LBA negativos para *P. jirovecii*. Apenas as Rondas 1 das bibliotecas *Griffin 1*, e *Tomlinson J* continuaram a mostrar ligação para o antígeno *Msg* recombinante utilizado, de acordo com os valores da técnica ELISA obtidos.

Continuando o processo de aquisição de *scFv*, foi elaborado o procedimento de expressão de partículas fágicas monoclonais, através da infeção de células de *E. coli TOP10F* com as rondas de seleção 1 das bibliotecas *Griffin 1*, e *Tomlinson J*. A finalidade era a produção de clones isolados, apenas um *scFv* por clone, isto é *scFv* monoclonais. Como resultado, foram obtidos dois clones de partículas monoclonais com *Griffin 1*, e cinco clones correspondentes à biblioteca *Tomlinson J*, apresentando valores expressivos para a presença do antígeno MsgC – selecionados com base em valores superiores a 0,3UA. Posto isto, estes sete clones foram novamente testados com as *pool* de amostras

anteriormente utilizadas e com MsgC para posterior análise e comparação. Os resultados obtidos continuaram altos na maioria dos clones face à detecção da glicoproteína *Msg* (Clones 3, 4, 5 e 6), e inconstantes para ambas as *pools*, não apresentando valores conclusivos entre elas.

Para concluir a busca de partículas fágicas monoclonais, interessava expressar fragmentos de anticorpos solúveis, infectando células de *E. coli HB2151* com três dos clones mais promissores (Clones 3, 4 e 5). Terminado o processo de expressão de fragmentos solúveis, cada infecção foi submetida a um teste ELISA indireta para verificar, não só a presença da expressão dos mesmos, como também verificar ligações específicas face ao antígeno MsgC e às *pools* de amostras positivas e negativas para *P. jirovecii*. A ausência de ligações específicas neste teste pode dever-se a uma ou mais de quatro razões que se passa a expor: (1) presença de sequências tóxicas que levam à destruição das ligações específicas antígeno-fago durante a amplificação e purificação das partículas fágicas (Hoogenboom et al. 1998); (2) contaminação durante a manipulação bacteriana (Jeong et al. 2010); (3) o uso de hospedeiros heterólogos que podem conter codões ou expressão regulatória limitados, levando à não expressão de fragmentos com sequências nucleótídicas certas, não se conseguindo ligar ao antígeno-alvo (Gustafsson et al. 2004; Goldman & Green 2015); (4) por fim, quando se faz a transferência do vetor para uma estirpe bacteriana, por exemplo *E. coli HB2151* (não supressora do codão lac), pode não acontecer a fusão entre o fragmento e a proteína gIII, expressando assim fragmentos não fundidos sem estrutura completa. Isto acontece quando existe um codão amber stop TAG adicional na região CDR dos fragmentos (Lee et al. 2007; Goldman & Green 2015). Esta quarta razão só pode confirmar-se na sequenciação obtida na Figura 17. Apesar da não expressão de fragmentos solúveis, os três clones (fagos monoclonais) selecionados foram novamente testados por ELISA indireta com LBA individuais tanto positivos como negativos para *P. jirovecii*, no intuito de se obter pelo menos uma forma de diagnóstico relevante. Este teste de ELISA mostrou-se inconclusivo, pois não se conseguiu obter os resultados esperados. Contudo, foi possível observar-se a presença de bandas com tamanho correspondente ao amplicão esperado nos três clones selecionados (Clones 3, 4 e 5). Assim, para confirmar que essas bandas correspondiam à amplificação do anticorpo recombinante, fez-se a sequenciação dos três clones. O resultado da sequenciação, visível na Figura 17, permite confirmar que, de facto, as bandas obtidas na PCR eram

correspondentes à sequência nucleotídica do vector *pHEN2*, para o Clone 4, com os *primers reverse pHEN2* e *forward LMB3* e respectivas sequências nucleotídicas (*pHEN2_seq*: CTA TGC GGC CCC ATT CA, *LMB3*: CAG GAA ACA GCT ATG AC). É possível observar-se esta mesma sequência, não só no protocolo de todo o procedimento elaborado neste projeto (Griffin 2001) como também noutros estudos (Cruz et al. 2013).

Outro teste também elaborado foi o de IFI, ao qual foram submetidos os três clones. Apenas o Clone 5 apresentou estruturas semelhantes a formas quísticas de *P. jirovecii*. No entanto, não foi possível confirmar se as imagens obtidas correspondem ao antígeno em estudo (Figura 18), devido ao tamanho que apresentam em comparação com a escala referida (100µm). Embora estas imagens apresentem morfologia semelhante a quisto de *P. jirovecii*, têm no entanto, maiores dimensões. Os quistos de *P. jirovecii* têm normalmente dimensões entre 4 a 6 µm (Calderón et al. 2010).

5.1.2 Seleção e expressão de regiões variáveis de fragmentos de anticorpos utilizando como antígeno lavado broncoalveolar e anticorpo anti-quisto de *P. jirovecii* e MsgC

Relativamente ao estudo dois realizou-se a captura de um fragmento mais específico, anti-quisto, utilizando-se na fase da imobilização ao imunotubo um anticorpo anti-quisto disponível no mercado. A escolha da utilização apenas da biblioteca *Griffin I* surgiu devido ao facto desta biblioteca combinatória apresentar um relatório de regiões variáveis de fragmentos de anticorpos humanos muito superior (de 1×10^{10}) (Goletz et al. 2002) ao das restantes bibliotecas supracitadas (*Tomlinson I* e *J* 1.47×10^8 e 1.37×10^8 , respetivamente) (Goletz et al. 2002). A adição do anti-quisto de *P. jirovecii* ajudaria numa triagem mais enriquecida.

Tanto na fase de obtenção de partículas (rondas) como na fase de validação em presença de antígeno por ELISA, as rondas obtidas neste estudo revelaram valores baixos de absorvância, indicando contradições face aos reagentes incorporados no processo de captura e não apresentando resultados substanciais para a presença do fragmento ideal.

No estudo três efetuou-se a seleção e procura de anticorpos recombinantes com uma glicoproteína, anteriormente purificada, MsgC de *P. jirovecii*, que poderia facilitar

a seleção de *scFv*. Devido ao facto do LBA positivo para *P. jirovecii* não apresentar só o antígeno de interesse, mas também outros, poderiam ser seleccionados, durante o processo de *biopanning*, *scFv* inespecíficos. A implementação da exclusividade neste estudo da biblioteca *Griffin 1*. ocorreu pela mesma razão apresentada no estudo dois, por esta possuir um maior repertório. Com o intuito de alargar a gama de possibilidades, foram também testados mais dois fagos *helper*, pertencentes ao mesmo grupo do fago filamentoso M13, para a produção de partículas fágicas completas. Contudo, nenhuma das rondas obtidas se revelou significativa, quando expostas ao antígeno, do qual foram capturadas (MsgC).

Reunindo todos os resultados obtidos no segundo e terceiro estudos, verificou-se que talvez a escolha da biblioteca *Griffin 1*. para captura de fagos não tivesse sido a mais acertada. Por um lado, por não se terem verificado ligações específicas antígeno-fago no teste de ELISA. Por outro lado, as partículas mais promissoras e utilizadas para testes posteriores de diagnóstico, como IFI, e mais tarde enviadas para sequenciação, foram as capturadas pela biblioteca *Tomlinson J*. Não há a certeza de que esta tenha sido a causa do insucesso de parte do estudo, mas é uma hipótese a considerar.

Na fase de detecção do antígeno *in vivo* (LBA individuais), muitas das vezes ocorreram incompatibilidades. Alguns estudos, relatam que esta técnica pode ter esta desvantagem (produção de ligações inespecíficas) (Skena 2005).

A utilização do bloqueante certo também suscita discussão. Após uma breve pesquisa bibliográfica (Goldman & Green 2015) e mesmo experimental, chegou-se à conclusão que o melhor bloqueante para ser utilizado em ELISA, para este projeto, seria o PBS-*Tween*. Outros bloqueantes foram testados, nomeadamente PVA1%, BSA1% e Gelatina1%, mas apenas o bloqueante PBS-*Tween*, apresentou absorvâncias na leitura em espectrofotometria. Este facto poderá indicar, que mesmo o bloqueante utilizado possa ter reagido fracamente. O mesmo pode ter acontecido com o uso do bloqueante durante o processo de *biopanning* (Bruin et al. 1999; Lou et al. 2001).

Contudo, uma outra hipótese para o pouco sucesso do estudo, também indicada por outros projetos com a mesma finalidade, recai sobre o facto de se ter utilizado um antígeno não purificado, LBA (Matz & Chames 2012). Esses estudos referem que para que haja uma maior eficácia na pesquisa dos fragmentos de anticorpos é mais aconselhável que se utilize um antígeno puro. A utilização de um LBA para a captura de

fragmentos, mostrou não ter sido fiável, pois há que ter em conta que as médias das absorvâncias foram maiores para ligações sensíveis entre antígeno-fago na presença de um antígeno mais puro, como a glicoproteína MsgC. As impurezas do lavado broncoalveolar podem ter interferido na fase de captura, retendo mais anticorpos inespecíficos, como pode verificar-se no gráfico da Figura 14, quando as variáveis, partículas fágicas, emitiram uma maior ligação antígeno-fago na presença de LBA de doentes negativos para *P. jirovecii*. Com base nos resultados obtidos, considera-se, então, que o ideal para a seleção dos *scFv*, deve ser a utilização de antígenos puros, como a MsgC recombinante. Por outro lado, não se conseguiu capturar partículas fágicas, no terceiro estudo, quando se utilizou a proteína purificada, talvez devido ao uso exclusivo da biblioteca *Griffin 1*.

5.2 Conclusões

Em conclusão, a estratégia realizada neste estudo tinha por base maior rapidez e eficácia no isolamento de um fragmento de anticorpo com alta especificidade e afinidade para o antígeno-alvo (*P. jirovecii*). Verificou-se o insucesso da obtenção de fragmentos e de apenas partículas fágicas monoclonais não específicas para todos os antígenos; um isolamento bem sucedido de fragmentos teria contribuído para a expansão da utilização desta tecnologia, no diagnóstico da PPc, não só por apresentar vantagens de rapidez em caso de se querer reproduzir um teste de diagnóstico rápido, como a sua aquisição poderia levar a um diagnóstico mais rápido em países em desenvolvimento, onde a PPc surge como uma doença relevante, tornando-se um problema de saúde pública. Por outro lado, é importante referir que a terapia através da utilização de anticorpos recombinantes tem-se revelado promissora na última década, face a tratamentos do cancro e de outras doenças do sistema imunológico (Zhou et al. 2015). O investimento nestas novas abordagens de biologia molecular, sem recorrer à manipulação animal, é da máxima importância.

O projeto aqui apresentado tinha como finalidade a obtenção de anticorpos recombinantes para o diagnóstico da pneumocistose o que não foi inteiramente conseguido. Todavia, o trabalho valeu pela experiência adquirida e pela recomendação de que é necessário trilhar outro caminho, onde esta experiência terá o seu lugar. Para um futuro projeto de investigação sugere-se a captura de fragmentos de anticorpos com a

glicoproteína purificada, utilizando outras bibliotecas combinatórias, como por exemplo *Tomlinson J.*

6. Referências bibliográficas

- Ag, M. & Strasse, L., 2011. High Affinity, Developability and Functional Size: The Holy Grail of Combinatorial Antibody Library Generation. , pp.3675–3700.
- Ahmad, Z.A. et al., 2012. ScFv antibody: Principles and clinical application. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, pp.15.
- Aliouat-Denis, C.M. et al., 2008. Pneumocystis species, co-evolution and pathogenic power. *Infection, Genetics and Evolution*, 8, pp.708–726.
- Aliouat-Denis, C.M. et al., 2009. The pneumocystis life cycle. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(May), pp.419–426.
- Anevlavis, S., Kaltsas, K. & Bouros, D., 2012. Prophylaxis for pneumocystis pneumonia (PCP) in non-hiv infected patients. *Pneumon*, 25(4), pp.348–350.
- Atzori, C. et al., 2007. Genotyping of Pneumocystis jiroveci Pneumonia Clinical Outcome Is Influenced by Dihydropteroate Synthase. , 45(5), pp.521–528.
- Barbas, C.F. et al., 1991. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(September), pp.7978–7982.
- Bava, A.J., Cattáneo, S. & Bellegarde, E., 2002. Diagnosis of pulmonary pneumocystosis by microscopy on wet mount preparations. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 44(5), pp.279–282.
- Bazan, J., Całkosiński, I. & Gamian, A., 2012. Phage display a powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 8(12), pp.1817–1828.
- Beck, J.M. & Cushion, M.T., 2009. Pneumocystis workshop: 10th anniversary summary. *Eukaryotic Cell*, 8(4), pp.446–460.
- Blount, R.J. et al., 2012. Serologic Responses to Recombinant Pneumocystis jirovecii Major Surface Glycoprotein among Ugandan Patients with Respiratory Symptoms. *PLoS ONE*, 7(12), pp.1–9.
- Bruin, R. de et al., 1999. Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nat Biotech*, 17(4), pp.397–399.
- Calderón, E.J. et al., 2010. Pneumocystis infection in humans: diagnosis and treatment. *Expert review of anti-infective therapy*, 8, pp.683–701.
- Calderón-Sandubete, E.J. et al., 2002. Historical perspective on Pneumocystis carinii infection. *Protist*, 153(3), pp.303–310.
- Carter, P., Bedouelle, H. & Winter, G., 1985. Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Research*, 13(12), pp.4431–4443.

- Cheng, S. et al., 2015. The epitope analysis of an antibody specifically against *Vibrio cholerae* O1 Ogawa by phage library study. *Journal of Microbiological Methods*, 117, pp.22–27.
- Chinnappan, J. & Lakshmi, P.T., 2011. *Pneumocystis jiroveci* pneumonia. *Asian J. Exp. Biol. Sci.*, 2(2), pp.171–176.
- Cornillot, E. et al., 2002. Fine analysis of the *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* genome by two-dimensional pulsed-field gel electrophoresis. *Gene*, 293(1-2), pp.87–95.
- Cristina, V. & Brás, R., 2012. *O uso de nanoanticorpos no design de vacinas*. Tese de mestrado. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias pp.49.
- Cruz, S. et al., 2013. Selection of Recombinant Antibodies by Phage Display Technology and Application for Detection of Allergenic Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*) in Processed Foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61, p.10310–10319.
- Cushion, M.T., 2004. *Pneumocystis*: Unraveling the cloak of obscurity. *Trends in Microbiology*, 12(5), pp.243–249.
- Cushion, M.T. & Smulian, a. G., 2006. *Pneumocystis* 2006: Summary of the research presented at the Ninth International Workshop on Opportunistic Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(SUPPL. 1), pp.602–604.
- Daly, K.R. et al., 2004. Enzyme-linked Immunosorbent Assay and Serologic Responses to *Pneumocystis jiroveci*. , 10(5), pp.848–854.
- Daly, K.R. et al., 2006. Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Prior *Pneumocystis* Pneumonia Exhibit Increased Serologic Reactivity to Several Major Surface Glycoprotein Clones. , 13(10), pp.1071–1078.
- Dei-Cas, E., 2000. *Pneumocystis* infections : the iceberg ? *Medical Microbiology*, (38), pp.23–32.
- Djawa, K. et al., 2010. Serum antibody levels to the *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein in the diagnosis of *P. jirovecii* pneumonia in HIV+ patients. *PLoS ONE*, 5(12), pp.1–8.
- Edman, J.C. et al., 1988. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature*, 334(6182), pp.519–522.
- Esteves, F. et al., 2014. *Pneumocystis* and *Pneumocystosis* : first meeting of experts from Latin-American and Portuguese-speaking countries – a mini-review, pp.545–548.
- Esteves, F. et al., 2012. *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping in pooled DNA samples: a new approach for clinical and epidemiological studies. *Clinical*

- microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(6), pp.E177–84.
- Fukuda, M.N., 2012. Peptide-displaying phage technology in glycobiology. *Glycobiology*, 22(3), pp.318–325.
- Gamkrelidze, M. & Da, K., 2014. T4 bacteriophage as a phage display platform. , pp.473–479.
- Gigliotti, F., 2005. Pneumocystis carinii: has the name really been changed? *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41, pp.1752–1755.
- Goldman, E. & Green, L.H., 2015. *Practical Handbook of Microbiology, Third Edition* 3rd ed., CRC Press. pp.1004
- Goletz, S. et al., 2002. Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. *Journal of molecular biology*, 315, pp.1087–1097.
- Gram, H. et al., 1992. In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library. , 89(April), pp.3576–3580.
- Griffin, L., 2001. Protocol for use of the Human Synthetic VH +. , pp.1–11.
- Gupta, B. et al., 2015. JBC Papers in Press . Published on November 4 , 2015 as Manuscript M115 . 679993
- Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J., 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22(7), pp.346–353.
- Hammers, C.M. & Stanley, J.R., 2014. Antibody phage display: technique and applications. *The Journal of investigative dermatology*, 134(2), p.e17.
- Haq, I.U. et al., 2012. Bacteriophages and their Implications on Future Biotechnology: A Review. *Virology Journal*, 9(1), p.9.
- Helweg-Larsen, J., 2004. Pneumocystis jiroveci. Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. *Danish Medical Bulletin*, 51(3), pp.251–273.
- Hibbett, D.S. et al., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111, pp.509–547.
- Hoogenboom, H.R. et al., 1998. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*, 4(1), pp.1–20.
- Huang, L. et al., 2011. HIV-associated Pneumocystis pneumonia. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 8(3), pp.294–300.
- Huggett, J.F. et al., 2008. Development and evaluation of a real-time PCR assay for

- detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *Thorax*, 63(2), pp.154–159.
- Ja, W.W. & Roberts, R.W., 2015. G-protein-directed ligand discovery with peptide combinatorial libraries. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(6), pp.318–324.
- Järvinen, T.A.H., May, U. & Prince, S., 2015. Systemically Administered , Target Organ-Specific Therapies for Regenerative Medicine. , pp.23556–23571.
- Jeong, Y. et al., 2010. Efficient selection of IgG Fc domain-binding peptides fused to fluorescent protein using *E. coli* expression system and dot-blotting assay. *Peptides*, 31(2), pp.202–206.
- Keynan, Y. et al., 2015. Cytokine Unique cytokine and chemokine patterns in bronchoalveolar lavage are associated with specific causative pathogen among HIV infected patients with pneumonia , in Medellin , Colombia. *CYTOKINE*, 73(2), pp.295–301.
- Krumpe, L.R.H. et al., 2006. T7 lytic phage-displayed peptide libraries exhibit less sequence bias than M13 filamentous phage-displayed peptide libraries. *PROTEOMICS*, 6(15), pp.4210–4222.
- Lee, C.M.Y. et al., 2007. Selection of human antibody fragments by phage display. *Nature protocols*, 2(11), pp.3001–3008.
- Liu, J.K.H., 2014. The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations. *Annals of Medicine and Surgery*, 3(4), pp.113–116.
- Lou, J. et al., 2001. Antibodies in haystacks: how selection strategy influences the outcome of selection from molecular diversity libraries. *Journal of Immunological Methods*, 253(1–2), pp.233–242.
- Lu, D. & Zhu, Z., 2014. Human Monoclonal Antibodies. , 1060, pp.185–213.
- Mandecki, W., Chen, J.Y.-C. & Grihalde, N., 1995. A Mathematical Model for Biopanning (Affinity Selection) Using Peptide Libraries on Filamentous Phage. *Journal of Theoretical Biology*, 176(4), pp.523–530.
- Martinez, A. et al., 2011. Ploidy of cell-sorted trophic and cystic forms of *pneumocystis carinii*. *PLoS ONE*, 6(6), p.e20935.
- Matsumoto, Y. & Yoshida, Y., 1984. Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. *The Journal of Protozoology*, 31(3), pp.420–428.
- Matz, J. & Chames, P., 2012. Phage Display and Selections on Purified Antigens. In P. Chames, ed. *Antibody Engineering SE - 11*. Methods in Molecular Biology.

- Humana Press, pp. 213–224.
- McCafferty, J. et al., 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348, pp.552–554.
- Medrano, F.J. et al., 2005. Pneumocystis jirovecii in general population. *Emerging Infectious Diseases*, 11(2), pp.245–250.
- Miller, R.F., Huang, L. & Walzer, P.D., 2013. Pneumocystis Pneumonia Associated with Human Immunodeficiency Virus. *Clinics in Chest Medicine*, 34(2), pp.229–241.
- Monroy-Vaca, E.X. et al., 2013. Prevalence and Genotype Distribution of Pneumocystis jirovecii in Cuban Infants and Toddlers with Whooping Cough. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(1), pp.45–51.
- Morris, A. & Norris, K.A., 2012. Colonization by pneumocystis jirovecii and its role in disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 25, pp.297–317.
- Mourez, M. & Collier, R.J., 2004. Use of phage display and polyvalency to design inhibitors of protein-protein interactions. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 261, pp.213–228.
- Nanduri, V. et al., 2007. Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption. , 22, pp.986–992.
- Palella, F.J. et al., 2012. NIH Public Access. , 57(3), pp.190–196.
- Rath, P.-M. & Steinmann, J., 2014. Update on Diagnosis of Pneumocystis Pulmonary Infections. *Current Fungal Infection Reports*, 8(3), pp.227–234.
- Redhead, S. a. et al., 2006. Pneumocystis and Trypanosoma cruzi: Nomenclature and typifications. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(July 2005), pp.2–11.
- Ribatti, D., 2014. From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application: An historical reappraisal. *Immunology Letters*, 161(1), pp.96–99.
- Rondot, S. et al., 2001. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nature Publishing Group*, 19, pp.75–78.
- S T, H. et al., 1995. Immunoblot analysis for serum antibodies to Pneumocystis carinii by age and intensity of infection in rats. *Korean J Parasitol*, 33(3), pp.187–194.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory. pp.2344.
- Schena, M., 2005. *Protein Microarrays*, Jones and Bartlett. pp.1004.
- Schirrmann, T. et al., 2011. Phage display for the generation of antibodies for proteome

- research, diagnostics and therapy. *Molecules*, 16(1), pp.412–426.
- Shukra, a M. et al., 2014. Production of recombinant antibodies using bacteriophages. *European journal of microbiology & immunology*, 4(2), pp.91–98.
- Smith, G.P. & Petrenko, V. a, 1997. Phage Display. *Chemical Reviews*, 97(96), pp.391–410.
- Smulian, A.G. et al., 1993. Geographic Variation in the Humoral Response to *Pneumocystis carinii*. *Journal of Infectious Diseases*, 167(5), pp.1243–1247.
- Smulian, A.G. et al., 2001. The ste3 pheromone receptor gene of *Pneumocystis carinii* is surrounded by a cluster of signal transduction genes. *Genetics*, 157, pp.991–1002.
- Souza, W. De & Benchimol, M., 2005. Basic biology of *Pneumocystis carinii*: a mini review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(December), pp.903–908.
- Stringer, J.R. et al., 2002. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), pp.891–896.
- Stringer, J.R., 1996. *Pneumocystis carinii*: What is it, exactly? *Clinical Microbiology Reviews*, 9(4), pp.489–498.
- Tasaka, S. & Tokuda, H., 2012. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients in the era of novel immunosuppressive therapies. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 18(6), pp.793–806.
- Thomas, C.F. & Limper, A.H., 2004. *Pneumocystis* Pneumonia. *N Engl J Med*, 350, pp.2487–98.
- Tomás, A.L.R., 2014. *Novas abordagens no diagnóstico serológico da pneumocistose*. Tese de mestrado. Instituto de Higiene e Medicina Tropical/ UNL pp.161.
- Tonelli, R.R. et al., 2013. Selection of binding targets in parasites using phage-display and aptamer libraries in vivo and in vitro. *Frontiers in immunology*, 3, pp.1–16.
- Vargas, S.L. et al., 2001. Search for Primary Infection by *Pneumocystis carinii* in a Cohort of Normal , Healthy Infants. , 32, pp.855–861.
- Wakefield, A.E., 2002. *Pneumocystis carinii*. *British Medical Bulletin*, 61, pp.175–188.
- Walzer, P.D., 1999. MINIREVIEWS Immunological Features of *Pneumocystis carinii* Infection in Humans. , 6(2), pp.149–155.
- Walzer, P.D. et al., 2009. NIH Public Access. , 199(May 2008), pp.1335–1344.
- Wyder, M.A., Rasch, E.M. & Kaneshiro, E.S., 1998. Quantitation of Absolute *Pneumocystis carinii* Nuclear DNA Content. Trophic and Cystic Forms Isolated

from Infected Rat Lungs are Haploid Organisms. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45(3), pp.233–239.

Zhou, C. et al., 2015. Phage display screening identifies a novel peptide to suppress ovarian cancer cells in vitro and in vivo in mouse models. *BMC Cancer*, pp.1–12.

Anexos

Anexo 1

Figuras esquemáticas dos vetores *pHEN2* e *pIT2*

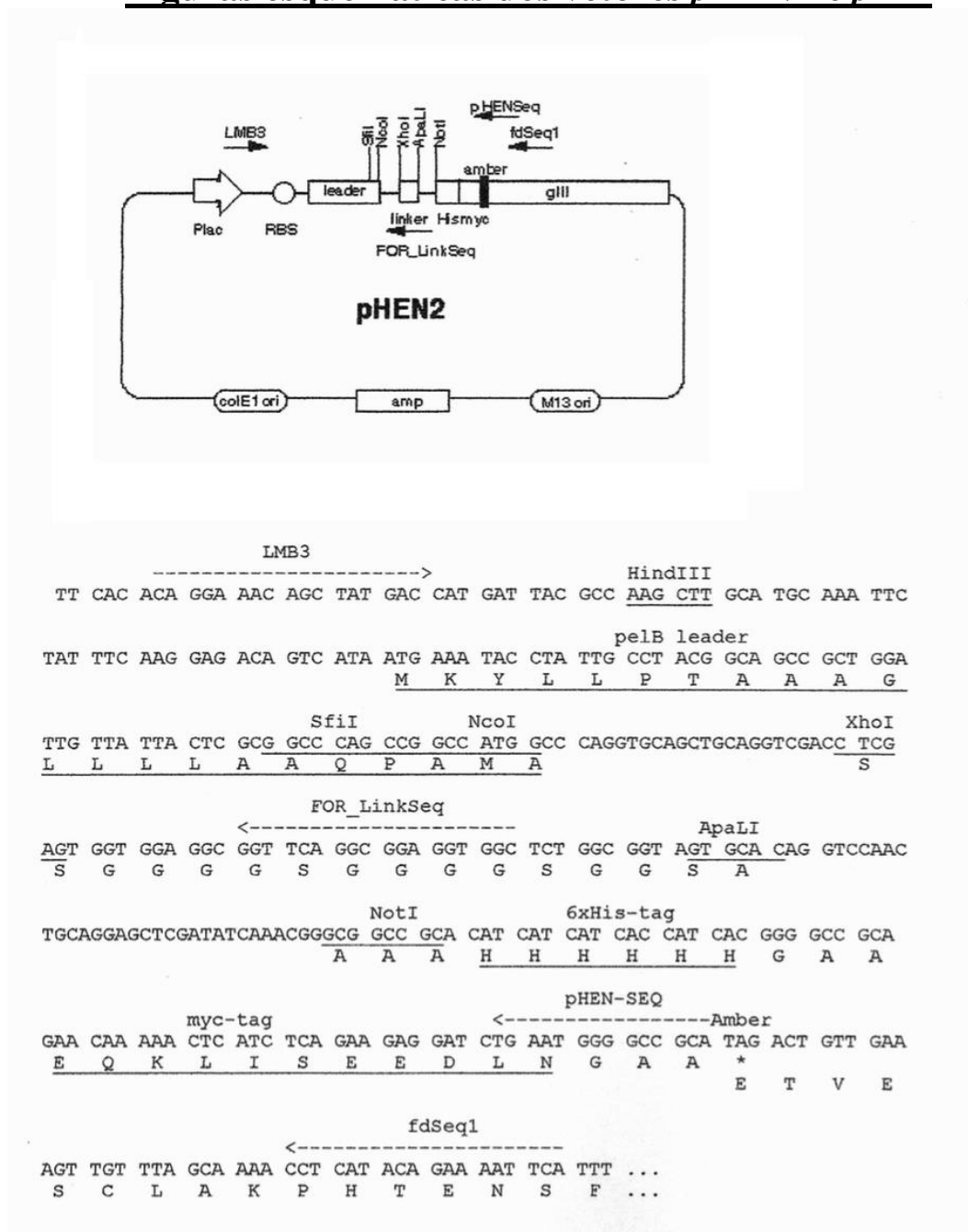


Figura A17. Vector pHEN2. Representação esquemática do vector pHEN2 fagomídeo (biblioteca Griffin 1.). Líder pelB: sinal de sequência peptídica de pectato-liase bacteriana que medeia a secreção para o espaço periplásmico; VH: fragmento variável de cadeia pesada; VL: cadeia leve; 6xHis: 6 histidina-tag; myc: myc-tag; âmbar: âmbar códon de parada; N1, N2, C-term: porções do N- e C-terminal da proteína pIII do fago capsídeo; LMB3 e pHENSeq: iniciadores utilizados para a sequenciação do domínio VH e VL, CAG GAA ACA GCT ATG AC e CTA TGC GGC CCC ATT CA, respetivamente (McCafferty et al. 1990).

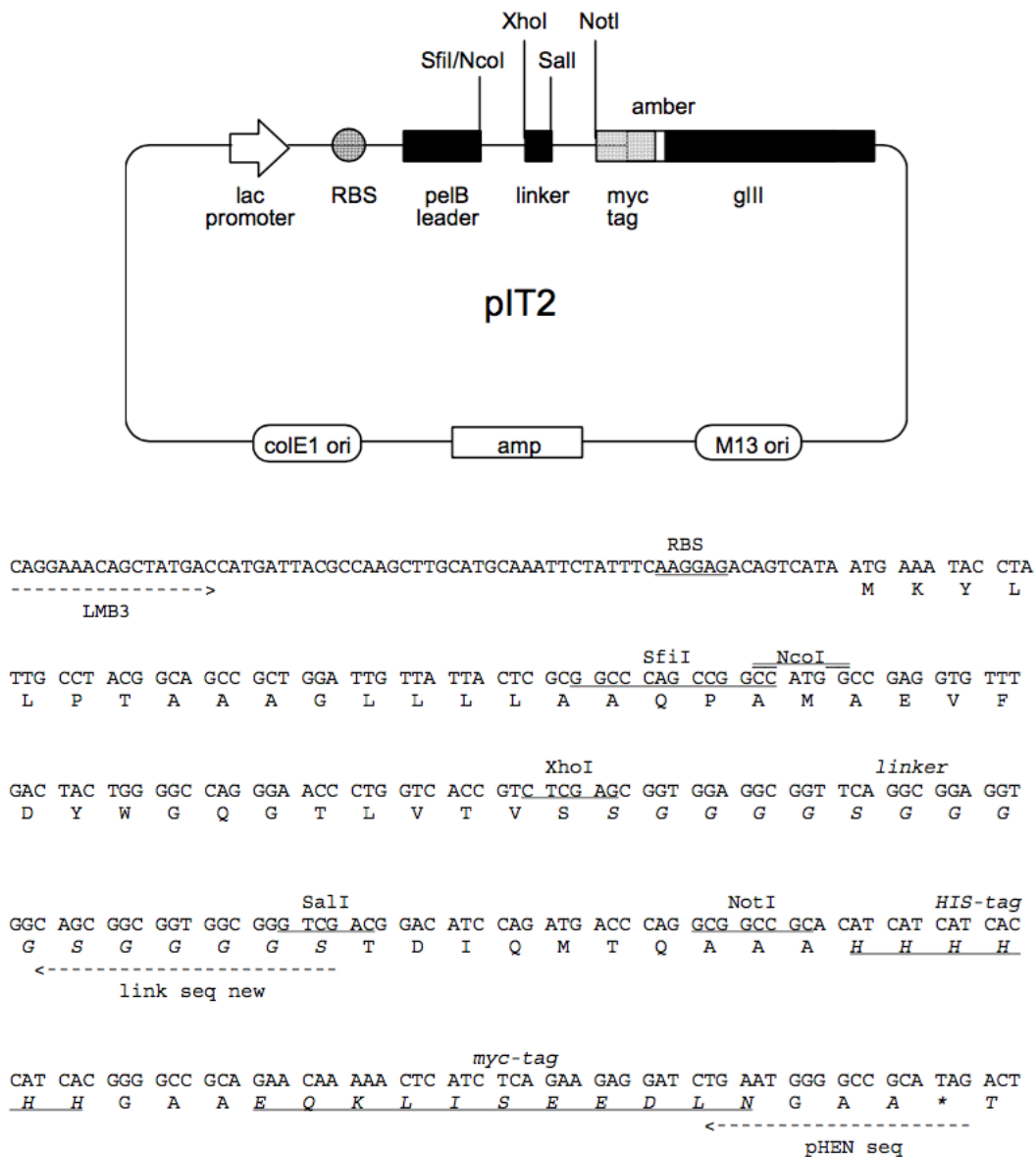


Figura A18. Vector pIT2. Representação esquemática do vector pIT2 fagomídeo (biblioteca Tomlinson). Líder pelB: sinal de sequência peptídica de pectato-liase bacteriana que medeia a secreção para o espaço periplásmico; VH: fragmento variável de cadeia pesada; VL: cadeia leve; 6xHis: 6 histidina-tag; myc: myc-tag; âmbar: âmbar códon de parada; N1, N2, C-term: porções do N- e C-terminal da proteína pIII do fago capsídeo; LMB3 e pHENSeq: iniciadores utilizados para a sequenciação do domínio VH e VL, CAG GAA ACA GCT ATG AC e CTA TGC GGC CCC ATT CA, respetivamente.

Anexo 2

Absorvâncias das rondas de seleção efetuadas

Quadro A6. Absorvâncias medidas em equipamento nanodrop de todas as rondas de seleção realizadas no presente projeto.

Estudo	Biblioteca	Helper	Rondas	269nm (mg/mL)	280nm (mg/mL)	320nm (mg/mL)
1	GriffinI	MK13	1	5,78	4,49	0,22
			2	3,61	3,13	0,12
			3	0,31	0,23	0,02
	TomlinsonJ		1	6,14	4,83	0,26
			2	4,25	3,65	0,14
			3	0,33	0,23	0,04
	TomlinsonI		1	4,90	3,88	0,18
			2	2,24	1,93	0,07
			3	0,46	0,37	0,05
2	GriffinI	MK13	1	1,05	0,79	0,08
			2	3,57	2,64	0,21
			3	8,18	7,67	1,19
3	GriffinI	MK13	1	3,43	2,76	0,42
			2	1,01	0,72	0,06
			3	1,62	1,33	0,08
		R408	1	1,91	1,50	0,25
			2	2,2	1,82	0,31
			3	2,19	1,74	0,2
		M13K07	1	0,26	0,16	0,02
			2	0,58	0,46	0,03
			3	0,58	0,45	0,02

Quadro A7. Absorvâncias medidas em equipamento de nanodrop dos três fagos *helper* utilizados no presente projeto

<i>Helper</i>	269nm (mg/mL)	280nm (mg/mL)	320nm (mg/mL)
MK13	3,86	3,37	0,26
R408	8,1	7,07	0,04
M13K07	2,58	2,13	0,07

Anexo 3

Médias das absorvâncias para detecção de partículas fágicas

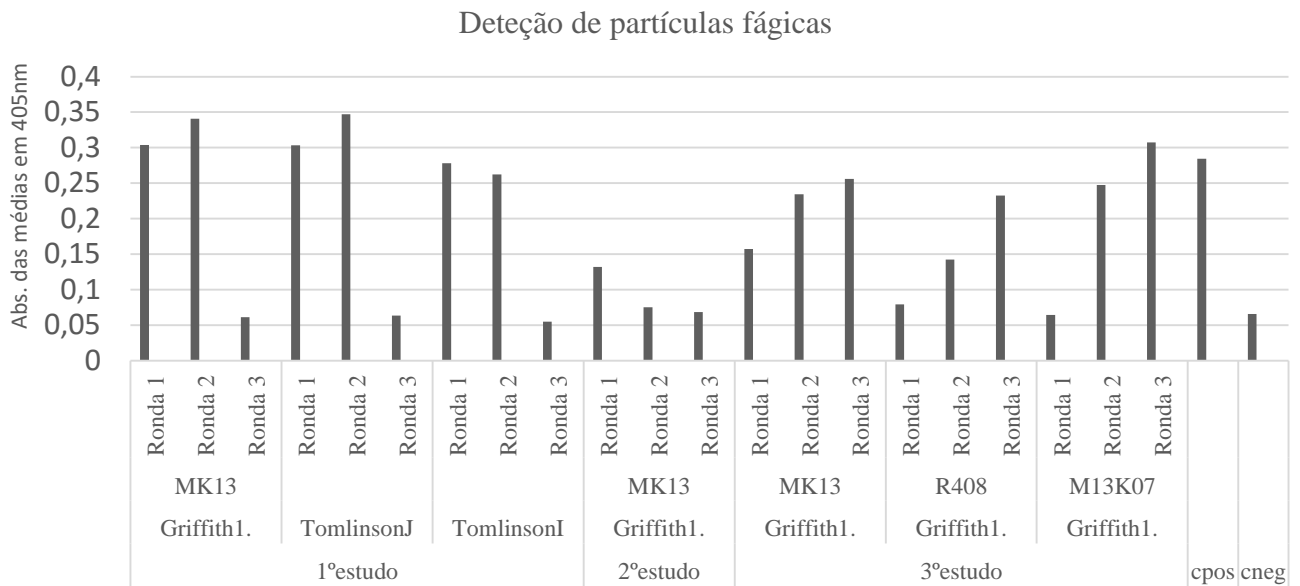


Figura A19. Gráfico representativo da presença de partículas fágicas em cada uma das rondas referente a todas as bibliotecas nos três estudos.